Postverlagsort Berlin

PLANTA

ARCHIV FÜR WISSENSCHAFTLICHE BOTANIK

BEGRÜNDET VON **W. RUHLAND** UND **H. WINKLER**

UNTER MITWIRKUNG VON
J. BONNER-PASADENA, **A. ERNST**-ZÜRICH, **H. v. GUTTENBERG**-ROSTOCK,
R. HARDER-GÖTTINGEN, **W. SCHUMACHER**-BONN

HERAUSGEGEBEN VON

L. BRAUNER
MÜNCHEN

E. BÜNNING
TÜBINGEN

55. BAND, 6. (SCHLUSS-)HEFT
MIT 61 TEXTABBILDUNGEN
(ABGESCHLOSSEN AM 29. NOVEMBER 1960)

SPRINGER-VERLAG
BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG
1960

Planta (Berl.)

Preis DM 31.60

Planta. Archiv für wissenschaftliche Botanik

Begründet 1925. Band 1—34 (1945) herausgegeben von *W. Ruhland* und *H. Winkler*. (Band 1—21, 1934, als „Zeitschrift für wissenschaftliche Biologie", Abteilung E.) Band 35—47. Herausgegeben von *W. Ruhland* und *O. Renner*. Band 48—51. Herausgegeben von *W. Ruhland*, *L. Brauner* und *E. Bünning*

Die Zeitschrift „Planta", Archiv für wissenschaftliche Botanik, steht in deutscher Sprache oder einer der Kongreßsprachen, sofern sie die Muttersprache des Autors ist, abgefaßten Originalarbeiten aus dem Gesamtgebiet der Botanik, abgesehen von solchen rein systematischen oder floristischen Inhalts, offen.

Die eingereichten Arbeiten sollen 2 Druckbogen (à 16 Druckseiten) in der Regel nicht überschreiten.

Arbeiten, welche einen Vermerk des Verfassers „Kurze Mitteilung" tragen, werden sobald wie möglich außerhalb der Reihenfolge des Eingangs abgedruckt. Ihr Umfang darf 4 Druckseiten nicht überschreiten; die Beigabe von Abbildungen ist nur in Ausnahmefällen angängig.

Die Zeitschrift erscheint zur Ermöglichung rascher Veröffentlichung zwanglos in einzeln berechneten Heften, die zu Bänden vereinigt werden.

Der Autor erhält einen Unkostenersatz von DM 20.— für den 16seitigen Druckbogen, jedoch im Höchstfalle DM 40. — für eine Arbeit. Für „Kurze Mitteilungen" wird ein Unkostenersatz nicht erstattet.

Grundsätzlich dürfen nur Arbeiten eingereicht werden, die vorher weder im Inland noch im Ausland veröffentlicht worden sind. Der Autor verpflichtet sich, sie auch nachträglich nicht an anderer Stelle zu publizieren. Mit der Annahme des Manuskriptes und seiner Veröffentlichung durch den Verlag geht das Verlagsrecht für alle Sprachen und Länder einschließlich des Rechts der fotomechanischen Wiedergabe oder einer sonstigen Vervielfältigung an den Verlag über. Jedoch wird gewerblichen Unternehmen für den innerbetrieblichen Gebrauch nach Maßgabe des zwischen dem Börsenverein des Deutschen Buchhandels e. V. und dem Bundesverband der Deutschen Industrie abgeschlossenen Rahmenabkommens die Anfertigung einer fotomechanischen Vervielfältigung gestattet. Wenn für diese Zeitschrift kein Pauschalabkommen mit dem Verlag vereinbart worden ist, ist eine Wertmarke im Betrage von DM 0.30 pro Seite zu verwenden. *Der Verlag läßt diese Beträge den Autorenverbänden zufließen.*

Die Mitarbeiter erhalten von ihrer Arbeit bis auf weiteres zusammen 75 Sonderdrucke unentgeltlich.

Aufnahmebedingungen siehe 3. Umschlagseite.

Alle Manuskripte und Anfragen sind zu richten an

Professor Dr. Leo Brauner, München 19, Menzingerstr. 67, Botanisches Institut der Universität, oder an

Professor Dr. Erwin Bünning, Tübingen, Botanisches Institut der Universität, Wilhelmstraße 5.

Springer-Verlag

Berlin-Wilmersdorf, Heidelberger Platz 3, Fernsprecher 830301
und
Heidelberg, Neuenheimer Landstr. 28—30, Fernsprecher 27901

55. Band **Inhaltsverzeichnis** 6. (Schluß-)Heft

Seite

BARTELS, H., Enzymaktivitäten in ruhenden und keimenden Samen von *Pinus nigra* ARN. Mit 14 Textabbildungen 573

KRULL, R., Untersuchungen über den Bau und die Entwicklung der Plasmodesmen im Rindenparenchym von *Viscum album*. Mit 10 Textabbildungen 598

SCHWARZE, P., Über die gesteigerte Peroxydaseaktivität in gestörten *Phaseolus*-Artbastarden. Mit 3 Textabbildungen 630

MOHR, H., und E. PETERS, Der Phototropismus und das lichtabhängige Längenwachstum des Hypokotyls von *Sinapis alba* L. Mit 6 Textabbildungen . 637

ZINSMEISTER, H. D., Das phototropische Verhalten der Blütenstiele von *Cyclamen persicum* HYBR. Mit 14 Textabbildungen 647

SCHNEIDER, G., Biochemische und entwicklungsphysiologische Untersuchungen zur Frage des Schossens und der Blütenbildung der Zuckerrübe. I. Mitteilung. Versuche zur experimentellen Beeinflussung der Blütenbildung und chemische Untersuchungen zum Nachweis der freien β-Indolylessigsäure. Mit 4 Textabbildungen 669

BRABEC, F., Über eine Mesochimäre aus *Solanum nigrum* L. und *Lycopersicon pimpinellifolium* MILL. Mit 10 Textabbildungen 687

Autorenverzeichnis 708

Planta 55, 573—597 (1960)

Aus dem Institut für Forstbotanik und Forstgenetik der Universität Göttingen in Hann.-Münden

ENZYMAKTIVITÄTEN IN RUHENDEN UND KEIMENDEN SAMEN VON *PINUS NIGRA* ARN.*

Von

HORST BARTELS

Mit 14 Textabbildungen

(Eingegangen am 23. August 1960)

A. Inhalt und Ausgangspunkte der Untersuchung

Die vorliegende Arbeit soll zur Erweiterung der Kenntnisse über die Enzymausstattung und deren Variabilität bei Waldbäumen beitragen. Sie behandelt Enzyme in den Samen von *Pinus nigra* ARN.

Über Enzyme in Nadelbaumsamen gibt es bisher folgende Befunde:

NICOLAI (1926) untersuchte die Samen von *Pinus silvestris* auf Lipase. Auf Katalase prüften SCHMIDT (1930) die Samen der gleichen Baumart und KOBLET (1932) die Samen von *Pinus strobus*. KOBLET (1937) untersuchte auch die Aktivität proteolytischer Enzyme in den Samen von *Pinus strobus*. HASEGAWA, TAKAYAMA und YOSHIDA (1953) fanden α- und β-Galactosidase in den Samen von *Pinus thunbergii* und *Pinus densiflora*. In den Samen von *Picea abies* ist nach CARDINI, LELOIR und CHIRIBOGA (1955) Uridinphosphatglucose-Fruktose-Transglucosidase vorhanden. SEIFTER (1954) stellte Coenzym A in Gymnospermensamen fest. STANLEY (1957) sowie STANLEY u. CONN (1957) untersuchten einige Enzyme des Krebs-Cyclus in Samen von *Pinus lambertiana*. Arginase wurde von GUITTON (1957) in *Abies*-Samen gefunden.

Meine Untersuchungen befassen sich mit dem Nachweis solcher Enzyme, die dem spektrophotometrischen Test nach WARBURG und CHRISTIAN (1936) zugänglich sind. Diese Methode erlaubt den gut reproduzierbaren Nachweis kleinster Enzymmengen. Außerdem ist sie auf eine größere Zahl von Enzymen anwendbar.

Alle Enzymbestimmungen wurden an Embryo und Endosperm getrennt durchgeführt, um Hinweise auf die biologische Bedeutung der einzelnen Enzyme zu gewinnen.

Auf einige Ergebnisse dieser Untersuchung wurde in einer vorläufigen Mitteilung bereits hingewiesen (BARTELS 1958).

* Herrn Prof. Dr. TH. SCHMUCKER zum 65. Geburtstag gewidmet.

B. Darstellung der Experimente und ihrer Ergebnisse

I. Allgemeine Erläuterung der Untersuchungsmethoden und -objekte

a) Die Bestimmung der Enzymaktivität. Die Enzymaktivität wurde mit dem optischen Test nach WARBURG und CHRISTIAN (1936) bestimmt und in Einheiten nach BÜCHER (s. BEISENHERZ u. a. 1953) angegeben.

Dieser Test beruht darauf, daß die reduzierte Form von Diphospho- und Triphosphopyridinnucleotid (DPN · H_2 bzw. TPN · H_2) Licht der Wellenlänge 340 mμ stark absorbiert. Die oxydierte Form der Nucleotide (DPN bzw. TPN) besitzt dieses Absorptionsmaximum nicht. Bei enzymatisch gesteuerten Reaktionen, die mit einer Oxydation oder Reduktion dieser Nucleotide verbunden sind, richtet sich die Geschwindigkeit dieser Vorgänge nach der Aktivität des katalysierenden Enzyms. Deshalb kann bei gleichbleibender Umsatzgeschwindigkeit nach BEISENHERZ, BOLTZE, BÜCHER u. a. (1953) die Extinktionsveränderung in der Zeiteinheit als Maß der Enzymaktivität verwendet werden. Eine Einheit (E) der Enzymaktivität liegt dann vor, wenn das Enzym in einem Testvolumen von 1 ml bei einer Schichtdicke von 1 cm in 100 sec eine Extinktionsveränderung von 0,1 hervorruft.

Die Teste führte ich im Photometer „Eppendorf" bei 366 mμ und 1 cm Schichtdicke bei Zimmertemperatur durch.

b) Die Herstellung der Extrakte. Das zu untersuchende Material wurde in einem Glashomogenisator nach POTTER und ELVEHJEM mit m/15 Phosphatpuffer p_H 7,5 homogenisiert, das Homogenat 10 min bei 25000 g abzentrifugiert und der Überstand als Enzympräparat verwendet. Als Zentrifuge wurde die „Pirouette" der Firma Phywe benutzt.

c) Die Bezugsgrößen. Die Enzymaktivität wurde anfangs auf ein Samenkorn sowie auf Frisch- und Trockengewicht bezogen. Die Feststellung des Trockengewichts des jeweils verwendeten Materials erfolgte mittelbar durch Parallelproben.

Da die Enzyme Eiweißnatur besitzen, ist es bei quantitativen Enzymbestimmungen üblich, die ermittelten Aktivitäten auch auf den Proteingehalt der Enzymlösung zu beziehen.

BÜCHER u. Mitarbeiter (1953) bestimmen die Proteinmengen mit Hilfe der Biuret-Methode und bezeichnen den Quotienten von Gesamtaktivität und Proteingehalt des Präparates als „spezifische" Aktivität. Die Biuret-Methode ist bei den hier untersuchten Objekten aber nicht anwendbar. Die Absorption des Cu-Eiweiß-Komplexes bei 547 mμ, die die Grundlage dieser Methode darstellt, wird nämlich dadurch empfindlich gestört, daß die Extrakte der Koniferensamen infolge des hohen Fettgehaltes stets mehr oder weniger getrübt sind, und die Embryo-Extrakte mit fortschreitender Keimung zunehmende Chlorophyllmengen enthalten.

Den Proteingehalt der Extrakte bestimmte ich deshalb hier in Anlehnung an den bei der Elektrophorese verwendeten Proteinnachweis (GRASSMANN und HANNIG 1952) durch Färbung mit Amidoschwarz 10 B (Fa. Merck). Hierzu wurden je nach Konzentration 0,02—0,04 ml des zu untersuchenden Rohextraktes als Tropfen auf Filtrierpapierstreifen aufgetragen und nach Trocknung in einer gesättigten Lösung von Amidoschwarz 10 B in 900 ml Methanol + 100 ml Eisessig 10 min bei Zimmertemperatur geschwenkt. Danach mußte der nicht an das Protein gebundene überschüssige Farbstoff in einem 10 min dauernden Bad von 10%iger Essigsäure bei 60° C entfernt werden. Nach dieser Behandlung waren die Filtrierpapierstreifen auf den leeren Stellen nur noch schwach blau. Aus den blauen proteinhaltigen

Flecken konnte nach deren Ausschneiden und Schütteln mit 5 ml einer Lösung von 2 Teilen Methanol und 1 Teil 1,0 n HCl im Reagensglas der Farbstoff gelöst werden. Sodann wurden die Extinktionen der erhaltenen Farblösungen bei 578 mμ und 1 cm Schichtdicke festgestellt und die Extinktion des Papierleerwertes davon abgezogen. Mit Hilfe von Eichkurven konnte dann von der Extinktion der Amidoschwarzlösungen auf den Proteingehalt der Flecken geschlossen werden. Zur Aufstellung der Eichkurven dienten Ei-Albumin-Lösungen, deren Konzentration mit der Biuret-Methode festgestellt worden waren. Die untersuchten Enzymlösungen hatten Proteingehalte von 0,02—0,2%. Bei Tropfengrößen von 0,02 und 0,04 ml verlief die Beziehung zwischen Amidoschwarzextinktion und Proteingehalt geradlinig. Gegenüber der intensiven Färbung kleinster Proteinmengen fallen die beigemengten Trübungsstoffe praktisch nicht ins Gewicht, falls sie nicht durch die Behandlung der Filtrierpapierstreifen sowieso mit entfernt worden sind.

Die auf Frisch- und Trockengewicht bezogenen Werte sind hier nicht dargestellt worden, da sie nichts Wesentliches bringen. Im Text werden sie jedoch erwähnt. Die auf das einzelne Samenkorn und den Proteingehalt der Extrakte bezogenen Werte finden sich in Abb. 12 und Abb. 14.

d) Die untersuchten Samen. Als Untersuchungsmaterial für die Enzymteste während der Keimung dienten Samen der Schwarzkiefer (*Pinus nigra* ARN.), die relativ groß sind (Tausendkorngewicht 21 g) und ein schnelles Herauspräparieren des Embryos erlauben. Für alle Versuche wurde Saatgut der gleichen Herkunft verwendet.

Im folgenden wird der weibliche Gametophyt als „Endosperm" und der Sporophyt im ruhenden sowie im keimenden Zustand bis zum Abwurf der Samenschale als „Embryo" bezeichnet. Der Begriff „Keimling" wird wie auch im allgemeinen Sprachgebrauch sowohl auf das keimende Samenkorn einschließlich Samenschale und Endosperm als auch auf das Pflänzchen nach Abwurf der Samenschale bis zum Erscheinen der Primärnadeln angewendet.

e) Die verwendeten Chemikalien. Die Biochemica stammen von den Firmen Boehringer (Mannheim), Schuchardt (München) und Sigma (St. Louis).

3-Glycerinaldehydphosphat für den Isomerase-Test erhielt ich von Herrn Professor Dr. BÜCHER.

Die Konzentrationen der verwendeten Substratlösungen wurden enzymatisch bestimmt.

f) Die Entstehung der den graphischen Darstellungen zugrunde liegenden Werte. In den Kurven, die den Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration veranschaulichen, stellt jeder Punkt das Mittel aus 3 Bestimmungen dar. Die p_H-Werte der einzelnen Testansätze wurden mit dem p_H-Acidometer und der Einstabmeßkette der Firma Lange (Berlin) geprüft.

In den graphischen Darstellungen, die die Veränderung der Enzymaktivität im Verlauf der Keimung aufzeigen, liegt jedem Punkt ein neuer Extrakt aus Samen zugrunde, die dem in der Abszisse angegebenen Keimstadium entstammen. Jeder Extrakt wurde zweimal getestet. Zur Prüfung der Reproduzierbarkeit der Kurvenverläufe dienten stichprobenartige Wiederholungen mit neuen Extrakten.

II. Untersuchungen über den Keimverlauf

a) Die Keimstadien. Die ins Keimbett eingebrachten lufttrockenen Samenkörner beginnen zunächst Wasser aufzunehmen und zu quellen. Nach einer gewissen, von der Art des Saatgutes und der Keimbedingungen abhängigen Zeit, erscheint erst bei einzelnen und dann bei einer wachsenden Zahl von Samen das Keimwürzelchen und beginnt sich geotrop zu krümmen. Diese Samen sind im Sinne der Keimprüfung „gekeimt" und entwickeln sich sehr individuell weiter. Nach Keimbeginn liegen deshalb die verschiedensten Entwicklungsstadien zu gleicher Zeit vor. Bei biochemischen Untersuchungen an Koniferensamen wurde dies bisher nicht berücksichtigt (MOTHES 1929, RÄDER-ROITZSCH 1957). Dafür waren sowohl arbeitstechnische Gründe maßgebend, als auch die Tatsache, daß die Autoren Gesamtbilanzen der stofflichen Veränderungen aufstellten. Aus den gleichen Gründen wurden auch Embryo und Endosperm nicht getrennt.

Zur Darstellung des Wechselspiels zwischen Endosperm und Embryo hinsichtlich der Enzymaktivität müssen diese jedoch gesondert betrachtet und die Samen entsprechend dem Keimfortschritt in Gruppen eingeteilt werden.

Bei den Wassergehaltsuntersuchungen und den Enzympräparationen faßte ich deshalb stets 20 Samen mit Embryonen gleicher Länge von der Wurzel- bis zur Kotyledonenspitze zu einer Probe zusammen. Die Samen befanden sich also auf einer gleichen Entwicklungsstufe. Im folgenden gebrauche ich dafür den Begriff „Keimstadium" und bezeichne ihn zahlenmäßig mit dem durchschnittlichen Frischgewicht der Embryonen einer solchen Probe.

Diese Keimstadien können beliebig gewählt werden. Im Keimstadium 10 mg waren die Embryonen z. B. 1,2—1,5 cm, im Keimstadium 80 mg, kurz vor Abwurf der Samenschale und der Endospermreste, 9 cm lang. Die Keimung begann mit dem Stadium 4—5 mg.

Da Keimlinge gleichen Entwicklungsstadiums nach verschiedenen Keimzeiten auftreten können, erhebt sich die Frage, ob die Keimzeit einen Einfluß auf die Stoffwechselsituation der Entwicklungsstadien hat. In Abb. 1 sind die Aktivitäten der Malat-Dehydrogenase im Embryo und Endosperm dreier Keimstadien in jeweils mehreren Altersstufen dargestellt. Die Enzymaktivität in Embryo und Endosperm gleich weit entwickelter aber unterschiedlich alter Keimlinge unterscheidet sich dort kaum voneinander. Damit ist nachgewiesen, daß sich Samen gleichen Keimstadiums nicht nur im Habitus, sondern auch etwa in der Stoffwechselsituation entsprechen, soweit man dies an der Enzymaktivität erkennen kann.

Einen gewissen Einfluß im Sinne einer Weiterentwicklung (Vergleich mit Abb. 12) scheint die Zeit allerdings auszuüben. Die dadurch bedingten

Aktivitätssteigerungen sind jedoch so gering, daß sie gegenüber den Aktivitätsdifferenzen verschiedener Keimstadien nicht ins Gewicht fallen. Die Kennzeichnung des Keimfortschrittes durch das in Milligramm Frischgewicht je Embryo ausgedrückte „Keimstadium" ist also gerechtfertigt.

Diese Keimstadien können natürlich erst dann ausgeschieden werden, wenn äußerlich sichtbare morphologische Veränderungen des Embryos

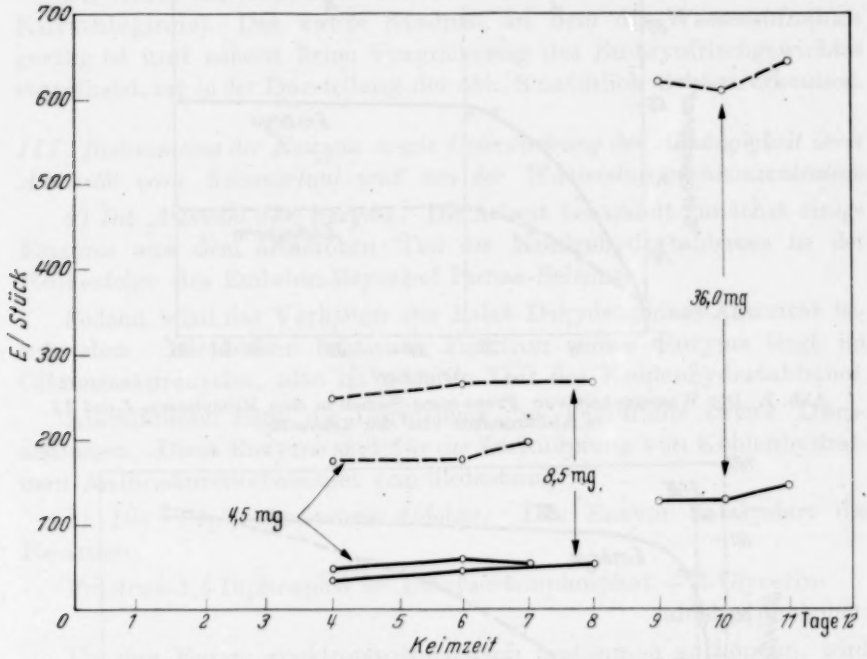


Abb. 1. Malat-Dehydrogenase-Aktivität im Embryo (———) und Endosperm (– – –) verschieden alter Keimlinge gleicher Entwicklungsstufe. Die Entwicklungsstufe wird durch das Frischgewicht des Embryos ausgedrückt und kennzeichnet damit das Keimstadium. Hier werden die Keimstadien 4,5 mg, 8,5 mg und 36,0 mg dargestellt

vorliegen. Das ist anfangs nicht der Fall. Deshalb wird dort der Keimfortschritt durch die Keimzeit gekennzeichnet. Infolge der geringfügigen Veränderungen, die die Enzymaktivitäten hier erfahren, können sich daraus keine Fehler ergeben.

b) Der Wassergehalt während der Keimung. Die Wasseraufnahme leitet die Keimung ein und ist auch für den weiteren Abbau der Reservestoffe entscheidend. Zur Beurteilung der gemessenen Enzymaktivitäten erschien deshalb eine Untersuchung des Wassergehaltes in Endosperm und Embryo der verschiedenen Keimstadien unerläßlich.

Die Samen keimten auf feuchtem Fließpapier mit Sandunterlage (0,2—0,5 mm Korngröße) bei konstant 25° C. Der Wasserspiegel stand 1 cm unter der Oberfläche des Keimbettes.

Die Wassergehaltsbestimmungen durch Trocknung bei 103° C ergaben, daß sich nach der Wasseraufnahme 3 Keimphasen unterscheiden lassen, die auch schon für andere Samen nachgewiesen wurden (Goo 1951, STANLEY 1958).

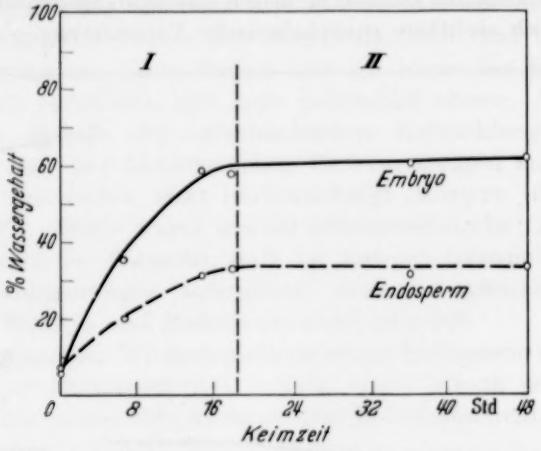


Abb. 2. Der Wassergehalt von *Pinus nigra*-Samen in den Keimphasen *I* und *II* in Abhängigkeit von der Keimzeit

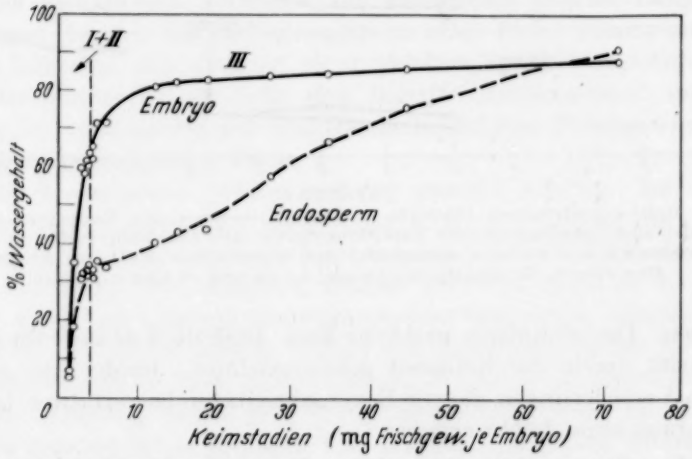


Abb. 3. Der Wassergehalt von *Pinus nigra*-Samen im Gesamtverlauf der Keimung (Keimphasen *I*, *II* und *III*) in Abhängigkeit vom Entwicklungszustand des Embryos

In der ersten Phase findet eine intensive Wasseraufnahme statt, die nach etwa 18 Std beendet ist. Dann steigt der Wassergehalt in einer zweiten Phase nur noch langsam an (Abb. 2). Das ändert sich in der dritten Phase nach Erscheinen der Radikula (Abb. 3). Der Wassergehalt im Embryo steigt dann sprunghaft und hat bei einer Radicula-

länge von etwa 8 mm seinen Endwert nahezu erreicht. Die hier angewandte Darstellung nach Keimstadien läßt erkennen, daß er im Endosperm dagegen in diesem dritten Stadium nur langsam zunimmt. Erst kurz bevor die Endospermreste als Häutchen abfallen, was unter den hier vorliegenden Bedingungen bei einem Embryofrischgewicht von 70—90 mg stattfindet, haben sie den Wassergehalt des Embryos erreicht.

Die Werte der Abb. 2 sind in Abb. 3 mit enthalten (die Punkte des Kurvenbeginns). Das zweite Stadium, in dem die Wasseraufnahme gering ist und nahezu keine Vergrößerung des Embryofrischgewichtes stattfindet, ist in der Darstellung der Abb. 3 natürlich nicht zu erkennen.

III. Bestimmung der Enzyme sowie Untersuchung der Abhängigkeit ihrer Aktivität vom Keimverlauf und von der Wasserstoffionenkonzentration

a) Die Auswahl der Enzyme. Die Arbeit behandelt zunächst einige Enzyme aus dem anaeroben Teil des Kohlenhydratabbaues in der Reihenfolge des Embden-Meyerhof-Parnas-Schemas.

Sodann wird das Verhalten der Malat-Dehydrogenase-Aktivität beschrieben. Die bisher bekannte Funktion dieses Enzyms liegt im Citronensäurecyclus, also im aeroben Teil des Kohlenhydratabbaues.

Abschließend folgt die Darstellung des Verhaltens zweier Transaminasen. Diese Enzyme sind für die Verknüpfung von Kohlenhydrat- und Aminosäurestoffwechsel von Bedeutung.

b) Die Diphosphofructose-Aldolase. Das Enzym katalysiert die Reaktion:

Fructose-1,6-Diphosphat $\rightleftharpoons$ Dioxyacetonphosphat + 3-Glycerinaldehydphosphat.

Um das Enzym spektrophotometrisch bestimmen zu können, wird im Test eine Hilfsreaktion angeschlossen, die durch das Enzym α-Glycerophosphat-Dehydrogenase katalysiert wird:

Dioxyacetonphosphat + DPN · H_2 $\rightleftharpoons$ -Glycerophosphat + DPN.

Die Testzusammensetzung lautete nach Bücher u. Mitarb. (1953):

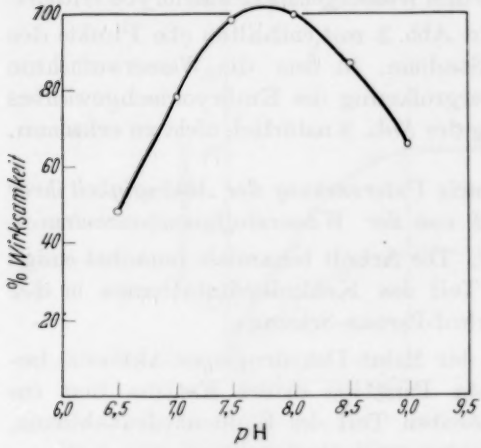
$1{,}5 \cdot 10^{-7}$ (Mol/ml) DPN · H_2,
$4 \cdot 10^{-6}$ (Mol/ml) Fructose-1,6-Diphosphat,
$2{,}5 \cdot 10^{-6}$ (g Protein je ml) Phosphotriose-Isomerase + α-Glycerophosphat-Dehydrogenase (Mischungsverhältnis 1:10), 0,2 ml Rohextrakt.

Die in die Küvette einpipettierten Volumina wurden mit m/20 Triäthanolaminpuffer p_H 7,5 auf ein Testvolumen von 2 ml abgestimmt. Die zugefügte Phosphotriose-Isomerase ermöglicht die vollständige Teilnahme des 3-Glycerinaldehydphosphates an der Hilfsreaktion durch dessen Überführungen in Dioxyacetonphosphat für den Fall, daß die

Aktivität der Phosphotriose-Isomerase im Rohextrakt dazu nicht ausreicht (s. auch unter c).

Das Aktivitätsoptimum lag bei dieser Testzusammensetzung zwischen p_H 7,5 und 8,0 (Abb. 4).

Unerwartet hoch war die Aktivität in Extrakten aus ruhenden Samen. Ihr Wert änderte sich auch während der Keimphasen I und II kaum:



Keimzeit Std	Aktivität pro Stück	
	Embryo	Endosperm
0	0,49	0,65
16	0,56	0,62

Abb. 4. Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration auf die Aktivität der Diphosphofructose-Aldolase aus ruhenden Embryonen von *Pinus nigra* in m/20 TRA-Puffer

Dies zeigt deutlich, daß mit den angewandten Methoden nicht die in vivo vorhandenen Enzymaktivitäten gemessen werden; denn der Stoffwechsel ruhender Samen ist im Vergleich zu dem eingequellter Samen verschwindend gering.

Erst als die Radicula sichtbar wurde, fand eine echte Erhöhung der Aktivität statt (Abb. 12). Die Aldolaseaktivität im weiteren Verlauf der Keimung stieg im Embryo. Mit dem Zuwachs an Trockenmasse aber hielt sie nicht Schritt.

Die Aktivität im Endosperm stieg anfangs auch, sank aber gegen Ende der Keimung, da dann offenbar auch die Enzymproteine abgebaut werden. Bezogen auf Trockengewicht stieg die Aktivität im Endosperm stetig, da im Verlauf der Keimung die Trockensubstanz dort abnimmt.

c) Die Phosphotriose-Isomerase. Das Enzym katalysiert folgende Reaktion:

3-Glycerinaldehydphosphat $\rightleftharpoons$ Dioxyacetonphosphat

Zur optischen Bestimmung wird ebenso wie beim Aldolasetest das Dioxyacetonphosphat mit Hilfe von α-Glycerophosphat-Dehydrogenase und DPN · H_2 in α-Glycerophosphat überführt. Die Testzusammensetzung lautete in Anlehnung an BEISENHERZ (1955):

$1{,}5 \cdot 10^{-7}$ (Mol/ml) DPN · H_2,
$5 \cdot 10^{-7}$ (Mol/ml) 3-Glycerinaldehydphosphat,
$2 \cdot 10^{-6}$ (g Protein je ml) α-Glycerophosphat-Dehydrogenase,

0,05 ml Rohextrakt $^1/_{10}$ verdünnt,
m/20 Triäthanolaminpuffer p_H 7,5,
Testvolumen 2 ml.

Das Aktivitätsoptimum lag mit dieser Testzusammensetzung bei p_H 8,0—8,5 (Abb. 5).

In den Keimphasen I und II herrschten die gleichen Verhältnisse wie auch schon bei der Aldolase. Die Enzymaktivitäten pro Stück wurden aus trockenen Samen ebenfalls fast in der gleichen Höhe gewonnen wie aus fertig gequollenen Samen:

Keimzeit	Aktivität pro Stück	
Std	Endosperm	Embryo
0	52	74
16	47	80

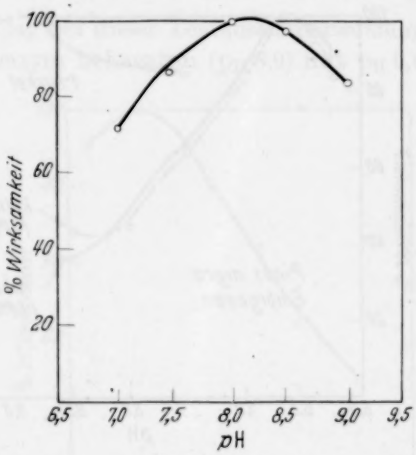


Abb. 5. Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration auf die Aktivität der Phosphotriose Isomerase aus ruhenden Embryonen von *Pinus nigra* in m/20 TRA-Puffer

Die Aktivität pro Stück war im Endosperm höher als im Embryo. In beiden Gewebegruppen stieg sie (Abb. 12), ging im Embryo aber nicht der Trockengewichtszunahme parallel.

d) Die Glyceraldehydphosphat-Dehydrogenase (oxydierendes Gärungsferment). Das Enzym katalysiert die folgende Reaktion:

3-Glyceraldehydphosphat + Phosphat + DPN $\rightleftharpoons$ 1,3-Diphosphoglycerinsäure + DPN · H_2.

Zur optischen Messung im isomerasehaltigen Extrakt wurde der Rücktest nach Bücher u. Mitarb. angewendet. Die 1,3-Diphosphoglycerinsäure wird dabei aus 3-Phosphoglycerinsäure in folgender durch das Enzym Phosphoglycerat-Kinase katalysierten Hilfsreaktion gebildet:

3-Phosphoglycerinsäure + Adenosintriphosphat $\rightleftharpoons$ 1,3-Diphosphoglycerinsäure + Adenosindiphosphat.

Die Testzusammensetzung lautete:
$1{,}5 \cdot 10^{-7}$ (Mol/ml) DPN · H_2,
$7 \cdot 10^{-6}$ (Mol/ml) 3-Phosphoglycerinsäure,
$1{,}7 \cdot 10^{-7}$ (Mol/ml) Adenosintriphosphat,
$3{,}3 \cdot 10^{6}$ (Mol/ml) Mg SO_4,
$1{,}2 \cdot 10^{-6}$ (Mol/ml) Gluthation reduziert,
$2 \cdot 10^{-5}$ (g Protein je ml) Phosphoglycerat-Kinase,

0,5 ml Rohextrakt,
m/20 Triäthanolaminpuffer p_H 7,5,
2 ml Testvolumen.

Die Erhöhung des Einsatzes der 3-Phosphoglycerinsäure und der Phosphoglycerat-Kinase gegenüber den Angaben bei BÜCHER u. Mitarb. (1953) beschleunigte die Reaktion auf das 5fache und gab ihr eine hinreichend gleichbleibende Geschwindigkeit.

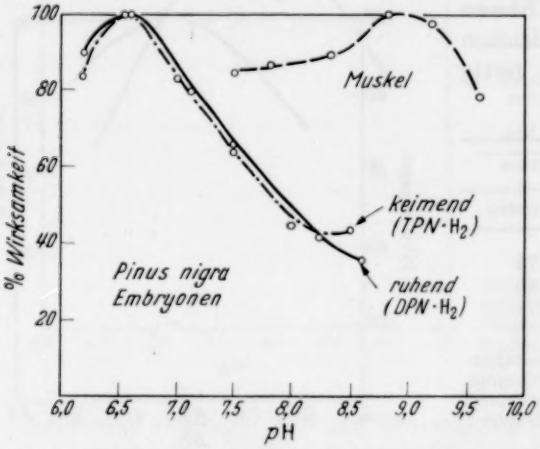


Abb. 6. Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration auf die Aktivität der Glyceraldehydphosphat-Dehydrogenase in m/20 TRA-Puffer

Im ruhenden Samen lagen geringere Aktivitäten vor als nach erfolgter Quellung:

Keimzeit Std	Aktivität pro Stück: Embryo	Aktivität pro Stück: Endosperm
0	0,15	0,68
6	0,37	1,00
20	0,44	1,25
31	0,36	1,30

Das Enzym reagierte mit DPN · H_2 am stärksten zu Keimbeginn und nahm dann in Endosperm und Embryo rasch ab (Abb. 12).

Nach HAGEMANN und ARNON (1955) tritt im photosynthetisierenden Gewebe von *Pisum* ein Enzym auf, das den gleichen Reaktionsmechanismus aufweist, jedoch mit TPN · H_2 arbeitet.

Auch bei *Pinus nigra*-Samen ergibt sich nach Einsatz von TPN · H_2 in grünen dem Licht ausgesetzten Gewebeteilen eine Reaktion, nämlich in den Embryonen der letzten Keimstadien (Abb. 12 und 14). Endospermextrakte zeigten keine Wirkung.

Damit sind die Ergebnisse von HAGEMANN und ARNON an einem neuen Objekt und mit einer anderen Methode bestätigt worden. Die zitierten Autoren verwandten den Arsenattest, bei dem die Reaktion ohne Phosphat aber unter Einsatz von Arsenat irreversibel in der Hin-Richtung läuft.

Nach Abb. 6 hatten die Reaktionen mit DPN · H_2 und mit TPN · H_2 das gleiche p_H-Optimum, welches im Vergleich mit dem aus Muskel gewonnenen Enzym (Firma Boehringer) sehr niedrig lag.

e) Die Lactat-Dehydrogenase. Das Enzym katalysiert die Reaktion:

$$\text{Brenztraubensäure} + \text{DPN} \cdot H_2 \rightleftharpoons \text{Milchsäure} + \text{DPN}.$$

Der optische Test nach KUBOWITZ und OTT (1943) wurde in folgender Zusammensetzung durchgeführt:

$1{,}5 \cdot 10^{-7}$ (Mol/ml) DPN · H_2,
$3{,}8 \cdot 10^{-6}$ (Mol/ml) Brenztraubensäure,
0,5 ml Rohextrakt,
m/20 Triäthanolaminpuffer p_H 7,5,
Testvolumen 2 ml.

Das p_H-Optimum der Aktivität lag bei dieser Testzusammensetzung im Vergleich mit dem von Muskelenzym bekannten (p_H 8,0) mit p_H 6,6 sehr niedrig (Abb. 7).

Die Aktivität pro Samen erfuhr im Lauf der Quellung keine Zunahme gegenüber den ruhenden Samen:

Keimzeit	Aktivität pro Stück	
Std	Embryo	Endosperm
0	0,85	0,26
18	0,83	0,27

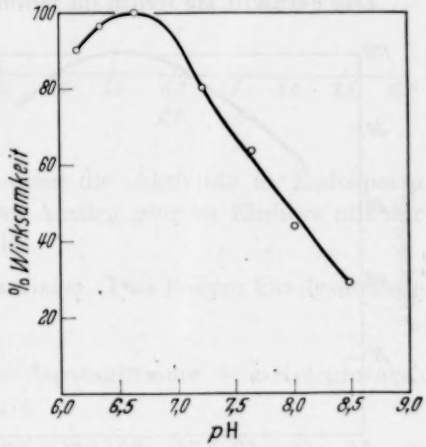


Abb. 7. Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration auf die Aktivität der Lactat-Dehydrogenase aus ruhenden Embryonen von *Pinus nigra* in m/20 TRA-Puffer

Die Abb. 12 weist nun ein bei den anderen Enzymen nicht beobachtetes Verhalten nach: Die Aktivität der Lactat-Dehydrogenase verschwand nach kürzester Zeit zuerst im Endosperm und dann im Embryo. Die geringen Aktivitäten im Endosperm legten den Gedanken dahe, das Enzym wäre durch Diffusion aus dem Embryo dorthin gelangt. Der Nachweis des Enzyms im Endosperm des ruhenden Samen zeigte jedoch, daß diese Annahme nicht zutrifft, sondern daß die dort gemessenen Aktivitäten auch endospermeigen sind.

f) Die Alkohol-Dehydrogenase. Das Enzym katalysiert die Reaktion:

$$\text{DPN} \cdot \text{H}_2 + \text{Acetaldehyd} \rightleftharpoons \text{Äthanol} + \text{DPN}.$$

Die Zusammensetzung des im Prinzip von RACKER (1955) angegebenen Testes betrug in Anlehnung an die Blutalkoholbestimmung (BÜCHER und REDETZKI 1951):

$5{,}0 \cdot 10^{-7}$ (Mol/ml) DPN,
$1{,}0 \cdot 10^{-7}$ (Mol/ml) Äthanol,

$7{,}5 \cdot 10^{-5}$ (Mol/ml) Semikarbazidhydrochlorid,
0,2 ml Rohextrakt,
m/20 Triäthanolaminpuffer p_H 7,5,
Testvolumen 2 ml.

Gemessen wurde in diesem Fall die Zunahme der DPN · H_2-Extinktion. Das Semikarbazid dient zum Abfangen des gebildeten Acetaldehyds.

Das p_H-Optimum lag für die angegebene Testzusammensetzung bei p_H 8,0 (Abb. 8).

Das Ferment lag schon im ruhenden Embryo in der gleichen Aktivität pro Stück vor wie im gequollenen. Im Endosperm stieg die Aktivität jedoch mit der Quellung:

Keimzeit Std	Aktivität pro Stück	
	Embryo	Endosperm
0	0,13	0,15
24	0,13	0,28

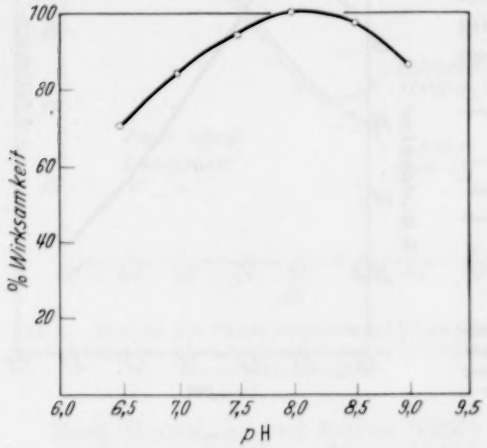


Abb. 8. Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration auf die Aktivität der Alkohol-Dehydrogenase aus ruhenden Embryonen von *Pinus nigra* in m/20 TRA-Puffer

Im Verlauf der Keimung nahm die Aktivität rasch ab, ohne jedoch ganz zu verschwinden, wie es bei der Alkohol-Dehydrogenase-Aktivität in grünen Erbsen der Fall war (GOKSÖYR, BOERI u. BONNICHSEN 1953).

g) Die Malat-Dehydrogenase. Das Enzym katalysiert die Reaktion:

$$\text{Oxalessigsäure} + \text{DPN} \cdot \text{H}_2 \rightleftharpoons \text{Äpfelsäure} + \text{DPN}.$$

Die Testzusammensetzung betrug in Anlehnung an OCHOA (1955):
$1{,}5 \cdot 10^{-7}$ (Mol/ml) DPN · H_2,
$2{,}5 \cdot 10^{-7}$ (Mol/ml) Oxalessigsäure,
0,05 ml Rohextrakt $^1/_{10}$ verdünnt,
m/20 Triäthanolaminpuffer p_H 7,5,
2 ml Testvolumen.

Das p_H-Optimum lag zwischen p_H 7,5 und 8,0 (Abb. 9) und damit um eine Einheit niedriger als das des Enzyms aus Herz (Firma Boehringer).

Die Aktivität pro Stück im ruhenden Samen entsprach der im gequollenen:

Keimzeit Std	Aktivität pro Stück	
	Embryo	Endosperm
0	40	94
17	43	92

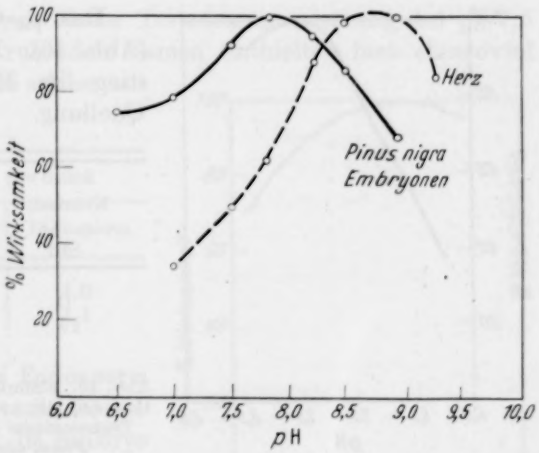


Abb. 9. Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration auf die Aktivität der Malat-Dehydrogenase in m/20 TRA-Puffer

Nach Erscheinen der Radicula stieg die Aktivität in Endosperm und Embryo rasch an (Abb. 12). Der Anstieg ging im Embryo mit der Zunahme an Trockengewicht parallel.

h) Die Glutamat-Aspartat-Transaminase. Das Enzym katalysiert die Reaktion:

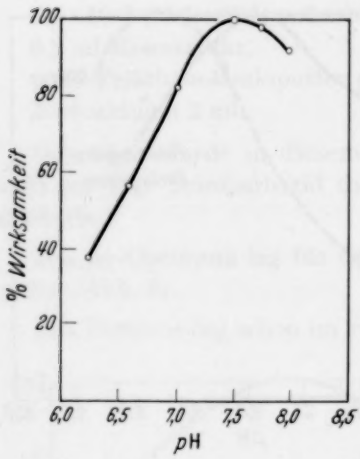
$$\text{Glutaminsäure} + \text{Oxalessigsäure} \rightleftharpoons \text{Asparaginsäure} + \alpha\text{-Ketoglutarsäure}.$$

Zur optischen Messung wird die gebildete Oxalessigsäure durch Malat-Dehydrogenase und DPN · H_2 in Äpfelsäure und DPN überführt (vgl. unter Abschnitt g).

Der Versuchsansatz war in Anlehnung an den für klinische Zwecke verwendeten Test (SGOT-Test der Firma Boehringer, Mannheim) folgender:

$4{,}2 \cdot 10^{-5}$ (Mol/ml) Asparaginsäure,
$2{,}0 \cdot 10^{-5}$ (Mol/ml) Ketoglutarsäure,
$1{,}5 \cdot 10^{-7}$ (Mol/ml) DPN · H_2,
$2{,}5 \cdot 10^{-2}$ (g/ml) Malatdehydrogenase,
0,1 ml Rohextrakt,
m/15 Phosphatpuffer p_H 7,5,
2 ml Testvolumen.

Die Testzusammensetzung von Jacobi (1957), insbesondere der Einsatz von Pyridoxalphosphat, führte nicht zu günstigeren Ergebnissen.



Das p_H-Optimum lag bei p_H 7,5 (Abb. 10). Die Aktivität pro Samen stieg im Endosperm während der Quellung.

Keimzeit Std	Aktivität pro Stück	
	Embryo	Endosperm
0	2,0	4,0
17	2,3	6,0

Abb. 10. Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration auf die Aktivität der Glutamat-Aspartat-Transaminase aus ruhenden Embryonen von *Pinus nigra* in m/5 Phosphatpuffer

Die Enzymaktivität pro Stück nahm dann im Embryo und Endosperm bis zum Ende der Keimung zu (Abb. 12).

i) Die Glutamat-Alanin-Transaminase. Das Enzym katalysiert die Reaktion:

Glutaminsäure + Brenztraubensäure $\rightleftharpoons$ Alanin + α-Ketoglutarsäure.

Zur Messung im optischen Test wird die gebildete Brenztraubensäure durch Lactat-Dehydrogenase und DPN · H_2 in Milchsäure und DPN überführt.

Der Versuchsansatz war in Anlehnung an den für klinische Zwecke verwendeten Test (SGPT-Test der Firma Boehringer, Mannheim) folgender:

$1{,}5 \cdot 10^{-7}$ (Mol/ml) DPN · H_2,

$1{,}0 \cdot 10^{-2}$ (g/ml) Lactat-Dehydrogenase,

$5{,}4 \cdot 10^{-5}$ (Mol/ml) Alanin,

$2{,}0 \cdot 10^{-5}$ (Mol/ml) Ketoglutarsäure,

0,5 ml Rohextrakt,

m/15 Phosphatpuffer p_H 7,5,

2 ml Testvolumen.

Der Einsatz von Pyridoxalphosphat führte nicht zu günstigeren Ergebnissen.

Ebenso wie bei der Glutamat-Aspartat-Transaminase lief der Test in dieser Zusammensetzung ohne feststellbare Anlaufzeit sehr lange mit gleichbleibender Geschwindigkeit.

Das p_H-Optimum lag mit dieser Testzusammensetzung bei p_H 7,5 (Abb. 11). Extrakte aus ruhenden Samen enthielten fast ebensoviel Aktivitäten pro Stück wie solche aus gequollenen Samen:

Keimzeit Std	Aktivität pro Stück	
	Embryo	Endosperm
0	1,0	1,0
24	1,1	1,1

Die Aktivität nahm im Endosperm nach kurzem Anstieg bis zum Keimstadium 10 mg wieder ab. Im Embryo stieg sie langsam aber stetig (Abb. 12).

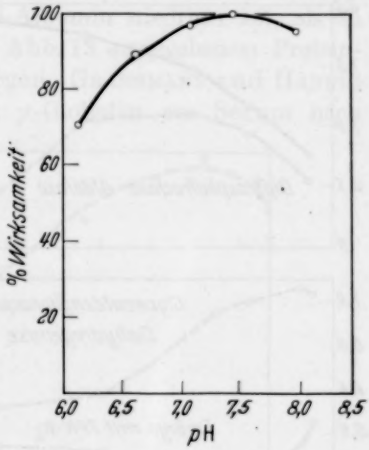


Abb. 11. Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration auf die Aktivität der Glutamat-Alanin-Transaminase aus ruhenden Embryonen von *Pinus nigra* in m/5 Phosphatpuffer

k) Proteinausbeute und spezifische Aktivität. Durch das Homogenisieren der Gewebeteile wurden Eiweißstoffe herausgelöst und deren enzymatische Wirksamkeiten durch die in den vorhergehenden Abschnitten beschriebenen Teste bestimmt. Das Verhältnis von Enzymaktivität zu Proteinmenge kann für die Beurteilung der Aktivitätsmessungen von Bedeutung sein und wird deshalb im folgenden dargestellt.

Abb. 13 zeigt die Proteinausbeute, die mit den hier angewandten Extraktionsmethoden erzielt wurde. Aus dem ruhenden Embryo ließen sich etwa 21% des Trockengewichts als Protein extrahieren. Nach Keimbeginn sank die extrahierbare Proteinmenge auf 15% und im weiteren Verlauf der Keimung auf 7—8%. Im Endosperm sank die extrahierbare Proteinmenge zunächst von 24 auf 16% und stieg dann auf etwa 75—80% der Trockensubstanz kurz vor dem Abwurf der Endospermreste um anschließend schnell wieder abzunehmen.

Es muß hier betont werden, daß die angegebenen Proteinmengen nur Richtwerte darstellen können, da die Eiweißarten durch den Farbstoff Amidoschwarz 10 B unterschiedlich stark angefärbt werden. Im wesentlichen ist die Zahl der basischen Gruppen für die Farbbindung verantwortlich (Grassmann und Hannig 1952).

Nach Jahne (1881) enthalten *Pinus nigra*-Samen ohne Samenschale etwa 23% Eiweiß im ruhenden Zustand bei 10% Wassergehalt der ganzen Samen. Der Gehalt an Stickstoff basischer Aminosäuren beträgt bei diesem Eiweiß nach Mothes ungefähr 30% des Gesamtstickstoffes und ist damit relativ groß.

Die hier mit der Amidoschwarzfärbung erhaltenen Werte gründen sich auf Eichkurven, die mit Ei-Albumin hergestellt wurden. Nach

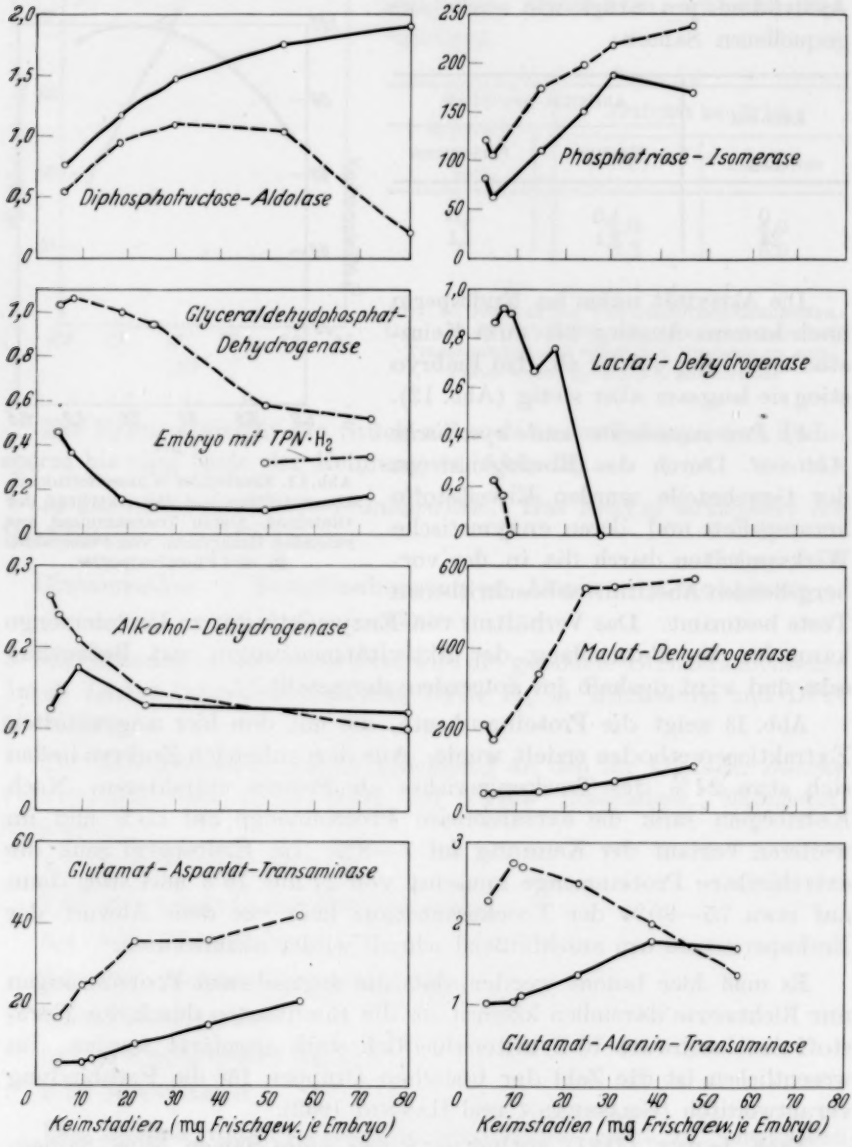


Abb. 12. Die Enzymaktivitäten in keimenden Samen von *Pinus nigra*. Die Werte sind auf den Embryo (———) bzw. das Endosperm (– – –) des einzelnen Samenkornes bezogen

den Angaben bei RAUEN (1956) haben von den Komponenten des Hühnerei-Albumins Conalbumin 23% und Ovalbumin 16,5% basische

Aminosäuren. Wenn diese Angaben in Grammprozent Aminosäure auch mit den Angaben in Aminosäure-Stickstoff bei MOTHES nicht direkt verglichen werden können, so deuten sie jedoch darauf hin, daß der Gehalt an basischer Aminosäuren im Ei-Albumin niedriger ist, als im Eiweiß aus *Pinus nigra*-Samen. Die in Abb. 13 angegebenen Proteinmengen werden deshalb etwas zu hoch liegen. GRASSMANN und HANNIG fanden z. B., daß gleiche Mengen von γ-Globulin aus Serum nach

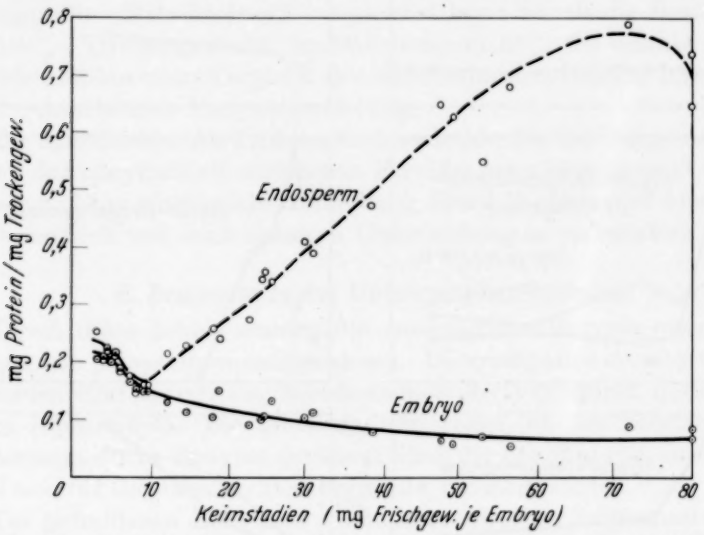


Abb. 13. Die Ausbeute an löslichem Protein nach Homogenisieren und Extrahieren mit m/15 Phosphatpuffer p_H 7,5. Die Werte sind in Milligramm Protein je Milligramm Trockensubstanz angegeben

Anfärben und Eluieren eine um 25% niedrigere Extinktion ergaben als von Albumin. Mit einem Fehler in dieser Größenordnung muß also gerechnet werden.

Der Basengehalt des extrahierbaren Eiweißes wird sich vermutlich im Keimverlauf nur unwesentlich ändern. Es kann deshalb wohl angenommen werden, daß der Kurvenverlauf in Abb. 13 die Verhältnisse im grundsätzlichen richtig darstellt. Abb. 14 zeigt nun die Enzymaktivitäten auf Milligramm Extraktprotein bezogen.

Betrachtet man zunächst die spezifische Aktivität der glykolytischen Enzyme, so stieg sie bei der Aldolase und bei der Isomerase im Embryo und Endosperm. Die nachgeordneten Enzyme Glyceraldehydphosphat-Dehydrogenase, Lactat-Dehydrogenase und Alkohol-Dehydrogenase dagegen zeigten nach Keimbeginn eine Aktivitätsabnahme. Die Lactat-Dehydrogenase war danach überhaupt nicht mehr nachzuweisen.

Die beiden Transaminasen verhielten sich verschieden: Die Aktivität der Glutamat-Alanin-Transaminase stieg im Embryo langsam an, sank

aber im Endosperm. Bei der Glutamat-Aspartat-Transaminase nahm sie dagegen im Embryo und Endosperm während der Keimung zu.

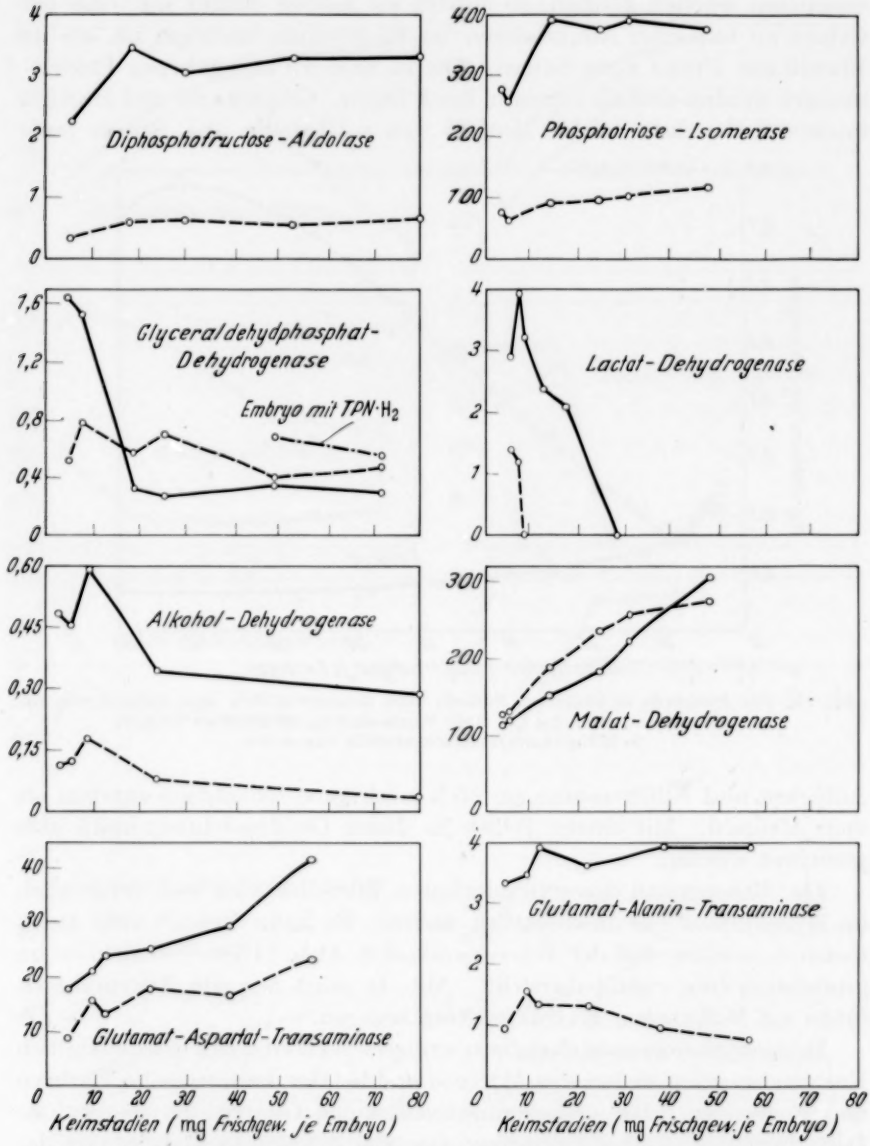


Abb. 14. Die Enzymaktivitäten je Milligramm Extraktprotein in Embryo (———) und Endosperm (— — — —) keimender Samen von *Pinus nigra* (spezifische Aktivitäten)

Ähnlich verhielt sich auch die Malat-Dehydrogenase.

Abb. 14 faßt also zunächst einmal die für die verschiedenen Enzyme durchgeführten Messungen zusammen. Die Entwicklungstendenzen der

dargestellten spezifischen Aktivitäten entsprechen dabei etwa denen, die die auf das einzelne Samenkorn bezogenen Werte zeigten (Abb. 12). Die spezifischen Aktivitäten ruhender und gequollener Samen vor Keimbeginn verhalten sich ebenfalls so wie die dargestellten Aktivitäten pro Samenkorn, da die Menge Extraktprotein pro Samenkorn sich in dieser Phase nicht ändert.

Ein Vorteil der spezifischen Aktivitäten liegt z. B. darin, daß die Bezugsgröße „Extrakteiweiß" vergleichsfähiger ist, als die Bezugsgröße „Stück", „Trockengewicht" und „Frischgewicht". Sie erlaubt deshalb in vielen Fällen einen Vergleich der verschiedensten Objekte hinsichtlich ihrer quantitativen Enzymausstattung.

Die spezifischen Aktivitäten sind weiterhin für die Frage nach dem Anteil des enzymatisch wirksamen Eiweißes am Gesamteiweiß von Bedeutung. Eine eingehende Behandlung dieses Problems ist hier jedoch nicht möglich und muß späteren Untersuchungen vorbehalten bleiben.

C. Besprechung der Untersuchungsergebnisse

Durch diese Arbeit wurden die untersuchten Enzyme erstmalig in Samen von *Pinus nigra* nachgewiesen. Die qualitative Ausstattung des haploiden Endosperms (weiblicher Gametophyt) entsprach der des Embryos (Sporophyt). Die grundsätzliche Frage, ob der Stoffabbau im Endosperm durch Enzyme gesteuert wird, die der Embryo ausscheidet, muß also für die untersuchten Fermente verneint werden.

Die gefundenen Enzyme werden den intensiven Stoffumsatz in keimenden *Pinus nigra*-Samen aktiv beeinflussen. Wie ich in den Untersuchungen zeigen konnte, ist ihre Wirksamkeit jedoch während der Keimung großen Änderungen unterworfen. Dies macht anschaulich, daß die Enzyme auch selber Objekte des Stoffwechsels sind. Es ist anzunehmen, daß die hier in vitro gemessenen Aktivitätsänderungen Hinweise auf die Bedeutung der von den Enzymen gesteuerten Prozesse geben können. Dies hängt natürlich weitgehend von der Wahl der Bezugsgröße ab.

Die auf die Gewichtseinheit bezogenen Aktivitäten können zeigen, inwieweit die Wirksamkeit eines Enzyms mit der Gewichtsabnahme im Endosperm oder der Gewichtszunahme im Embryo während der Keimung parallel geht. Die auf das einzelne Endosperm bzw. den einzelnen Embryo bezogenen Werte vermitteln eine sehr klare Vorstellung darüber, wie sich die Gesamtaktivität eines Individuums verändert. Die biologisch sinnvollste Bezugsgröße stellt infolge der Eiweißnatur der Fermente der Proteingehalt der den Aktivitätsmessungen zugrunde liegenden Extrakte dar. Zur Deutung der Aktivitätsänderungen wird deshalb die Wirksamkeit pro Milligramm Extraktprotein herangezogen.

Anhaltspunkte gibt es bei der Glutamat-Aspartat-Transaminase, die im Asparaginstoffwechsel eine Rolle spielt. Die spezifische Aktivität

dieses Enzyms stieg im Keimverlauf stetig an. Bei MOTHES (1929) nahm in *Pinus nigra*-Keimlingen auch der Asparagingehalt bis zum Abwurf der Samenschale zu. Der in vitro beobachteten Aktivitätssteigerung dürfte demnach eine Aktivitätszunahme in vivo entsprechen.

Für eine Verallgemeinerung dieser Annahme ist sicher das Erreichen eines in dem betreffenden Keimstadium maximal möglichen Wassergehalts Voraussetzung. Aus den ruhenden Samen lassen sich nämlich auch hohe Aktivitäten extrahieren, obwohl dort nachweislich nur ein sehr geringer Stoffwechsel stattfindet. Keinesfalls ist ein Schluß von den Aktivitätswerten der Extrakte auf die Höhe der in vivo wirksamen Aktivität möglich, da der Enzymgehalt der Zellen, soweit bekannt, bedeutend höher ist, als er nach der Intensität des Stoffwechsels zu sein brauchte (LANG 1953). Die an Homogenaten gemessenen Werte werden deshalb auch als „potentielle Aktivitäten" bezeichnet (HOFFMANN-OSTENHOF 1954).

Einleitend untersuchte ich den Wassergehalt der keimenden *Pinus nigra*-Samen. Daß die Wasseraufnahme die Keimung, besonders aber den Keimbeginn, entscheidend beeinflußt, ist seit langem bekannt (Literaturübersicht bei TOOLE u. a. 1955). Meine Untersuchungsergebnisse unterstreichen dies nun besonders dadurch, daß sie Wassergehalt und Enzymaktivität vergleichen. Es wäre ja denkbar, daß die Enzyme erst nach der Quellung auftreten und so den Keimbeginn beeinflussen. Dies ist aber nicht der Fall. Die untersuchten Fermente liegen unerwarteterweise bereits im ruhenden Samen in etwa der gleichen Höhe wie im gequollenen potentiell wirksam vor. Der Keimbeginn ist also nicht von ihnen, sondern nur von der Quellung abhängig, die die Enzyme auch in vivo wirksam werden lassen kann.

Die Untersuchungen zeigten für den weiteren Keimverlauf, daß die Höhe der Enzymaktivität im Embryo und Endosperm sich nach dem Entwicklungszustand des Embryos richtete. Dabei war es fast gleichgültig, ob bis zum Erreichen dieses Entwicklungsstadiums eine kürzere oder längere Keimzeit verstrich. Dies beweist, daß man zur biologisch richtigen Beschreibung des Keimfortschritts auch bei Stoffwechseluntersuchungen nur das Entwicklungsstadium der Keimlinge, nicht aber die Keimzeit verwenden kann.

Mit der Aldolase, der Phosphotriose-Isomerase und der Glyceraldehydphosphat-Dehydrogenase funktionieren neben den von STANLEY 1957 nachgewiesenen Enzymen des Citronensäurecyclus auch Fermente des anaeroben Teils des Kohlenhydratabbaus im Embryo und Endosperm.

Da Koniferensamen einen relativ großen Gehalt an fetten Ölen besitzen (*Pinus silvestris* z. B. 40% nach RÄDER-ROITZSCH) werden die untersuchten Enzyme hauptsächlich beim Abbau der aus der Lipolyse stammenden Kohlenhydrate wirksam sein. Es existieren aber auch

geringe Mengen von Kohlenhydraten als Reservestoffe in Koniferensamen. So besteht nach RÄDER-ROITZSCH (1957) der ruhende *Pinus silvestris*-Samen zu 4,49% des Trockengewichts aus Zucker. Auch *Pinus nigra*-Samen werden einen gewissen Kohlenhydratgehalt besitzen, der aber quantitativ wie qualitativ von den an Koniferensamen bereits untersuchten Werten abweichen kann. Qualitative Unterschiede zeigten sich z. B. nach HASEGAWA, TAKAYAMA und SHIROYA (1951) bei den Zuckergehalten von *Larix leptolepis* und *Pinus densiflora*.

Die 3 genannten Enzyme könnten aber in Embryonen der letzten Keimstadien auch im Photosynthesezyklus tätig sein. In der Endphase der Keimung ist die Photosynthese nämlich möglich, da zu diesem Zeitpunkt die inzwischen ergrünten Kotyledonen schon teilweise dem Licht ausgesetzt sind. Eine TPN-abhängige Glyceraldehydphosphat-Dehydrogenase, die nach HAGEMANN und ARNON (1955) in photosynthetisierenden Geweben aktiv ist, konnte jedenfalls in diesem letzten Keimstadium in den Kotyledonen nachgewiesen werden. In den früheren Phasen, in denen z. T. auch schon Chlorophyllbildung vorliegt, die Kotyledonen aber noch vom Endosperm umschlossen sind, war das Enzym dagegen nicht vorhanden.

Die Anwesenheit der Lactat-Dehydrogenase und der Alkohol-Dehydrogenase weist darauf hin, daß die Kohlenhydrate im Samenkorn von *Pinus nigra* sowohl zu Milchsäure als auch zu Alkohol vergären können.

Milchsäurebildung wurde bereits durch SCHNEIDER (1941) in keimenden Samen einiger Pflanzenarten beim Erscheinen der Radicula festgestellt. Sie war obligatorisch und durch Anaerobiose nicht zu beeinflussen. Der Autor brachte sie mit den einleitenden Wachstumsvorgängen in Verbindung. Eine Alkohol-Dehydrogenase fanden GOKSÖYR, BOERI und BONNICHSEN (1953) im gleichen Stadium keimender Erbsen. Die Alkoholbildung erfolgte hier nur unter Anaerobiose, war also fakultativ. Auch in Bohnen wurde bei Keimung in Temperaturen über 30° C sowie in Stickstoffatmosphäre Alkohol- und Milchsäurebildung festgestellt (OOTA, FUJII und SUNOBE 1956).

Beide Enzyme waren in *Pinus nigra*-Keimlingen kurz vor und beim Erscheinen der Radicula besonders aktiv. Mit dem beginnenden Wurzelwachstum fielen nach den hier dargelegten Untersuchungsergebnissen die optimale Möglichkeit der Alkohol- und Milchsäurebildung sowie eine sehr schnelle Wassergehaltszunahme im Embryo und ein beginnender Wassergehaltsanstieg im Endosperm zusammen.

Weiterhin setzte zu diesem Zeitpunkt bei *Pinus silvestris* nach RÄDER-ROITZSCH eine deutliche Zunahme des Gesamtzuckergehaltes ein, und STANLEY (1958) fand beim beginnenden Radiculawachstum von *Pinus lambertiana* einen Anstieg der Sauerstoffaufnahme in Embryo und Endosperm.

Die Analyse dieser parallel gehenden Erscheinungen wird das Problem der potentiellen Gärungsschritte bei der Keimung der Koniferensamen einer Lösung näher bringen.

Einen weiteren Hinweis auf die biologische Bedeutung der Lactat- und Alkohol-Dehydrogenase in keimenden Koniferensamen könnte die von KUSNEZOWA (zit. bei WACH 1942) bei *Pinus silvestris* und *Picea abies* sowie von GOO und FURUSAWA (1955) bei *Pinus densiflora* und *Pinus thunbergii* nachgewiesene vorübergehende Stärkebildung in der Quellungsphase dieser Samen geben.

Die angegebenen Befunde sprechen meines Erachtens dafür, daß die beiden Enzyme in einem Regulationsmechanismus tätig sind, der zwischen einem Überangebot von Spaltprodukten des anaeroben Kohlenhydratabbaus und der Unmöglichkeit, diese Spaltprodukte sofort oxydativ weiter abzubauen, vermittelt. Die aus den Kohlenhydraten anaerob gebildete Brenztraubensäure geht dann nicht in den Citronensäurecyclus ein, sondern wird in Milchsäure und Alkohol überführt.

Als begrenzender Faktor für die Aktivität des oxydativen Systems beim Keimbeginn kommt der Wassergehalt in Frage. Die oxydativen Enzyme sind an Strukturelemente des Plasmas, die Mitochondrien, gebunden und deshalb auch vom Quellungszustand abhängig. Außerdem wäre denkbar, daß ihre Tätigkeit in den Anfangsstadien der Keimung noch dadurch behindert wird, daß der Zellinhalt zum größten Teil aus nicht mobilisierten Reservestoffen besteht.

Wie von anderen Objekten bekannt ist, hemmen der Sauerstoff bzw. die aktiven Atmungssysteme den anaeroben Kohlenhydratabbau, so daß nur wenig überschüssige Brenztraubensäure entsteht. Diese Wirkung ist als Pasteur-Effekt bekannt (Literaturübersicht bei TURNER 1951).

Auch bei den hier untersuchten keimenden Samen wird in den späteren Keimstadien mit größerem Wassergehalt der oxydative Stoffabbau soweit funktionieren, daß er den anaeroben Kohlenhydratabbau in dieser Weise hemmt und so eine Milchsäure- bzw. Alkoholbildung nicht mehr in Frage kommt.

Die Malat-Dehydrogenase war das aktivste Enzym im Endosperm und das zweitwirksamste im Embryo. Es erscheint deshalb möglich, daß das Enzym hier nicht nur im Citronensäurecyclus vorkommt, sondern auch noch an anderen Stoffwechselzweigen beteiligt ist. Vielleicht wirkt es zusammen mit der Glutamat-Aspartat-Transaminase bei der Asparaginsäurebildung. Diese Möglichkeit deutete HOFFMANN-OSTENHOFF (1954) an. Daß es 2 Enzyme dieses Typs im gleichen Gewebe gibt, zeigten CHRISTIE und JUDAH (1953) sowie BÜCHER und KLINGENBERG (1958) an zoologischen Objekten. Die beiden Enzyme unterschieden sich bei BÜCHER und KLINGENBERG unter anderem auch durch ihr p_H-Optimum. Nach Abb. 9 der hier niedergelegten Arbeit hat aber die Malat-Dehydrogenase-Aktivität von Rohextrakten aus ruhenden *Pinus nigra*-Embryonen nur ein p_H-Optimum. Obwohl also mehr als eine Malat-Dehydrogenase in *Pinus nigra*-Samen vermutet werden können, geben die vorhandenen Versuchsergebnisse noch keine eindeutigen Hinweise darauf.

Das einzige Enzym, dessen Aktivität sich in Embryo und Endosperm entgegengesetzt entwickelte, war die Glutamat-Alanin-Transaminase. Im Endosperm verhielt es sich wie die Glyceraldehydphosphat-Dehydrogenase, die Lactat-Dehydrogenase und die Alkohol-Dehydrogenase, die beim Radiculadurchbruch ihre stärkste Aktivität aufwiesen. Im Embryo glich sein Verhalten dem der übrigen Enzyme, deren spezifische Aktivität mit fortschreitender Keimung stieg.

Zusammenfassung der Ergebnisse

Enzymteste mit Hilfe der spektrophotometrischen Methode nach Warburg und Christian (1936) an Homogenaten von ruhenden und keimenden Samen von *Pinus nigra* Arn. haben folgendes ergeben (Enzymaktivität bezogen auf Extraktprotein):

1. Die Enzyme Glyceraldehydphosphat-Dehydrogenase, Lactat-Dehydrogenase und Alkohol-Dehydrogenase weisen zur Zeit des Keimbeginns in Embryo und Endosperm ein Aktivitätsmaximum auf. Im weiteren Verlauf der Keimung sinkt ihre Aktivität. Die Lactat-Dehydrogenase ist dann gar nicht mehr nachzuweisen. Ein Aktivitätsmaximum im Zeitpunkt des Radiculadurchbruches mit anschließendem Aktivitätsabfall zeigt im Endosperm außerdem noch die Glutamat-Alanin-Transaminase.

2. Die Aktivität der Enzyme Diphosphofructose-Aldolase, Phosphotriose-Isomerase, Malat-Dehydrogenase und Glutamat-Aspartat-Transaminase steigt in Embryo und Endosperm während der Keimung an. Ebenso verhält sich die Glutamat-Alanin-Transaminase im Embryo.

3. Aus den ruhenden Samen lassen sich fast alle Enzyme mit etwa der gleichen Aktivität extrahieren wie aus den gequollenen kurz vor Keimbeginn. Nur die Aktivität der Glyceraldehydphosphat-Dehydrogenase ist in Embryo und Endosperm und die Aktivität der Alkohol-Dehydrogenase und der Glutamat-Aspartat-Transaminase im Endosperm ruhender Samen niedriger.

4. Die Höhe der Enzymaktivität ist vor allen Dingen vom Entwicklungszustand der Keimlinge und nur zu einem geringen Teil von der Keimzeit abhängig.

5. Das p_H-Optimum liegt für die Glyceraldehydphosphat-Dehydrogenase und die Lactat-Dehydrogenase in m/20 Triäthanolaminpuffer zwischen p_H 6,5 und p_H 7,0. Für die Diphosphofructose-Aldolase, die Phosphotriose-Isomerase, die Alkohol-Dehydrogenase und die Malat-Dehydrogenase liegt es unter den gleichen Bedingungen zwischen p_H 7,5 und p_H 8,5. Ebenso verhalten sich die beiden Transaminasen in m/5 Phosphatpuffer.

Meinem verehrten Lehrer, Herrn Professor Dr. TH. SCHMUCKER, danke ich für seine Unterstützung, die mir zu einem Studienaufenthalt am Physiologisch-chemischen Institut der Universität Marburg verhalf und die Durchführung dieser Arbeit am Institut für Forstbotanik und Forstgenetik der Universität Göttingen in Hann.-Münden ermöglichte.

Dem Direktor des Instituts für Physiologische Chemie in Marburg, Herrn Professor Dr. TH. BÜCHER, danke ich für die Überlassung eines Arbeitsplatzes und ihm sowie Herrn Dr. HOHORST für vielseitige Anregung und Hilfe.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danke ich für ein Stipendium sowie für Sachbeihilfen.

Literatur

BARTELS, H.: Enzyme in keimenden Samen von *Pinus nigra* ARN. Naturwissenschaften **45**, 495 (1958).

BEISENHERZ, G.: Triosephosphat isomerase from calf muscle. Methods Enzymology **1**, 387—391 (1955).

—, H. J. BOLTZE, TH. BÜCHER, R. CZOK, K. H. GARBADE, E. MEYER-AREND u. G. PFLEIDERER: Diphosphofructose-Aldolase, Phosphoglyceraldehyd-Dehydrogenase und Pyruvat-Kinase aus Kaninchenmuskulatur in einem Arbeitsgang. Z. Naturforsch. **8b**, 555—577 (1953).

BÜCHER, TH., u. M. KLINGENBERG: Wege des Wasserstoffs in der lebendigen Organisation. Angew. Chem. **70**, 552—570 (1958).

—, u. H. REDETZKI: Eine spezifische photometrische Bestimmung von Äthylalkohol auf fermentativem Wege. Klin. Wschr. **29**, 615—616 (1951).

CARDINI, C. E., L. F. LELOIR and J. CHIRIBOGA: The biosynthesis of sucrose. J. biol. Chem. **214**, 149—155 (1955).

CHRISTIE, G. S., and I. D. JUDAH: Intracellular distribution of enzymes. Proc. roy. Soc. B **141**, 420—433 (1953).

GOKSÖYR, J., BOERI and R. K. BONNICHSEN: The variation of ADH and catalase activity during the germination of the green pea *(Pisum sativum)*. Acta chem. scand. **7**, 657—662 (1953).

GOO, M.: Water absorption by tree seeds. Bull. Tokyo Univ. For. **39**, 55—60 (1951).

—, and K. FURUSAWA: Changes in the stores food within the seeds of *Pinus densiflora* and *Pinus thunbergii* during the course of germination. J. jap. forest Soc. **37**, 481—484 (1955).

GRASSMANN, W., u. K. HANNIG: Ein quantitatives Verfahren zur Analyse der Serumproteine durch Papierelektrophorese. Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. **290**, 1—27 (1952).

GUITTON, Y.: Sur le métabolisme azoté des Gymnospermes. Présence de l'arginase dans les graines. C. R. Acad. Sci. (Paris) **245**, 1157—1160 (1957).

HAGEMANN, R. H., and E. I. ARNON: Changes in glyceraldehyde phosphate dehydrogenase during the life cycle of a green plant. Arch. Biochem. **57**, 421—436 (1955).

HASEGAWA, M., T. TAKAYAMA and T. SHIROYA: The carbohydrates contained in seeds. Kagaku (Science) **21**, 593—597 (1951).

— — and S. YOSHIDA: Carbohydrases of coniferous seeds. J. jap. forest. Soc. **35**, 156—157 (1953).

HOFFMANN-OSTENHOF, O.: Enzymologie. Wien 1954.

JAHNE, L.: Die chemische Zusammensetzung einiger Waldsamen. Zbl. ges. Forstwesen **7**, 364—366 (1881).

Jacobi, G.: Enzyme des Aminosäure-Stoffwechsels in *Ulva Lactuca*. Transaminasen und Aminosäuredehydrogenasen. Planta (Berl.) **49**, 561—577 (1957).

Koblet, R.: Über die Keimung von *Pinus strobus* unter besonderer Berücksichtigung der Herkunft des Samens. Ber. Schweiz. bot. Ges. **41**, 199—283 (1932).

— Über die proteolytische Aktivität von Weymouthskiefern- und Weizensamen unter besonderer Berücksichtigung des Einflusses der Vorkühlung. C. R. Ass. intern. d'Essais de Semences **2**, 228—253 (1937).

Kubowitz, F., u. P. Ott: Isolierung und Kristallisation eines Gärungsfermentes aus Tumoren. Biochem. Z. **314**, 94—117 (1943).

Lang, K.: Die Biologie der Enzyme. 4. Mosbacher Colloquium der Ges. für Physiol. Chemie, S. 1—31, 1953.

Mothes, K.: Physiologische Untersuchungen über das Asparagin und das Arginin in Coniferen. Ein Beitrag zur Theorie der Ammoniakentgiftung im pflanzlichen Organismus. Planta (Berl.) **7**, 585—649 (1929).

Nicolai, H. W.: Die Bestimmung der Lipase in keimenden Kiefernsamen. Biochem. Z. **174**, 373—383 (1926).

Ochoa, S.: Malic dehydrogenase from pig heart. Methods in Enzymology **1**, 735—739 (1955).

Oota, Y., R. Fujii and Y. Sunobe: Studies on the connexion between sucrose formation and respiration in germinating bean cotyledons. Physiol. Plantarum **9**, 38—50 (1956).

Racker, E.: Alcohol dehydrogenase from bakers yeast. Methods Enzymology **1**, 500—503 (1955).

Räder-Roitzsch, J. E.: Quantitative Stoffänderungen bei der Keimung von *Pinus silvestris* L. Forstwiss. Zbl. **76**, 229—245 (1957).

Rauen, H. M.: Biochemisches Taschenbuch, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1956.

Schmidt, W.: Unsere Kenntnis vom Forstsaatgut. Berlin 1930.

Schneider, A.: Über das Auftreten der Milchsäure in höheren Pflanzen, insbesondere während der Keimung. Planta (Berl.) **32**, 234—267 (1941).

Seifter, E.: The occurrence of coenzyme A in plants. Plant Physiol. **29**, 403—406 (1954).

Stanley, R. G.: Krebs cycle activity of mitochondria from endosperm of sugar pine seed (*Pinus lambertiana* Dougl.). Plant Physiol. **32**, 409—412 (1957).

— Gross respiratory and water uptake patterns in germinating sugar pine seed. Physiol. Plantarum (Cph.) **11**, 503—515 (1958).

—, and E. C. Conn: Enzyme activity of mitochondria from germinating seedlings of sugar pine (*Pinus lambertina* Dougl.). Plant Physiol. **32**, 412—418 (1957).

Toole, E. H., S. B. Hendricks, H. A. Borthwick and V. K. Toole: Physiology of seed germination. Ann. Rev. Plant Physiol. **7**, 299—318 (1956).

Turner, J. S.: Respiration. The pasteur effect in plants. Ann. Rev. Plant Physiol. **2**, 145—168 (1951).

Wach, A.: Vergleichende Untersuchungen mit verschiedenen Färbeverfahren als Ersatz oder Ergänzung der Keimprüfung bei forstlichen Sämereien. Tharandt. forstl. Jb. **93**, 143—193 (1942).

Warburg, O., u. W. Christian: Pyridin, der wasserstoffübertragende Bestandteil von Gärungsfermenten (Pyridin-Nucleotide). Biochem. Z. **287**, 291—328 (1936).

Doz. Dr. H. Bartels,
Institut für Forstbotanik und Forstgenetik
der Universität Göttingen, Hann.-Münden

Planta 55, 598—629 (1960)

Aus dem Botanischen Institut der Universität Bonn

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DEN BAU UND DIE ENTWICKLUNG DER PLASMODESMEN IM RINDENPARENCHYM VON *VISCUM ALBUM**

Von

RETA KRULL

Mit 10 Textabbildungen

(Eingegangen am 29. August 1960)

A. Einleitung

Die Bedeutung der Plasmodesmen für das Zusammenleben der Einzelzellen eines vielzelligen Pflanzenorganismus wurde bereits von TANGL (1879) erkannt.

Seither ist in einer Fülle von Arbeiten versucht worden, Bau, Entstehung und Entwicklung dieser Strukturen zu ergründen, um Einblick in ihre Funktion zu gewinnen.

Trotzdem gelang es in mehr als einem halben Jahrhundert lichtmikroskopischer Plasmodesmenforschung nur, die Existenz der Zellbrücken sicherzustellen: Es konnte an zahlreichen Beispielen gezeigt werden, daß Plasmodesmen bei allen höheren Pflanzen vorkommen (Literatur bei MÜHLDORF 1937 und MEEUSE 1957) und daß sie innerhalb einer Pflanze alle lebenden Zellen der ausdifferenzierten Gewebe miteinander verbinden (KUHLA 1900, HILL 1901, LIVINGSTON 1933).

Unbeantwortet blieb dagegen die Frage nach dem Feinbau der Plasmodesmen, ihrer Entstehung, Entwicklung und Funktion. Der Grund dafür liegt in der Schwierigkeit, Plasmodesmen überhaupt sichtbar darzustellen. Sind sie doch mit wenigen Ausnahmen so zart, daß sie an der Grenze der Auflösung des Lichtmikroskops liegen und in der Regel nur mit vergröbernden Methoden — Quellung der Wand, Fixierung und Färbung — sichtbar gemacht werden können. Eine Untersuchung der Plasmodesmen im lebenden Gewebe, ein Schluß auf ihre wirkliche Größe und Gestalt war also bisher kaum möglich.

Weil der Vergleich mit dem lebenden Plasma fehlte, konnte auch der Einwand, es handele sich bei den beobachteten Strukturen gar nicht um Plasma, sondern um tote Zellwandbestandteile (JUNGERS 1930), nur indirekt durch mehr oder weniger theoretische Beweisführungen entkräftet werden (MÜHLDORF 1937).

* Teilabdruck einer Dissertation der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Bonn (D5). Das vollständige Exemplar kann an der obigen Stelle eingesehen werden.

Darüber hinaus ließen sich Plasmodesmen mit Sicherheit nur in älteren Membranen nachweisen, nicht aber in jungen Wänden vor Beginn der sekundären Verdickung (Literatur bei MEEUSE 1957). War damit schon das Vorkommen von Plasmodesmen in Primärmembranen zweifelhaft, so blieb ihre Entstehung völlig im Dunkeln.

Durfte man aus dem Versagen der Darstellungsmethoden auf ein Fehlen von Plasmodesmen in jungen Wänden schließen? Dann mußte man annehmen, daß das Plasma nachträglich in die Wand eindrang (STRASBURGER 1901) oder die Primärmembran zunächst völlig durchsetzte, sich später zurückzog und dabei als Reste die Plasmodesmen hinterließ (MEEUSE 1957). Deutete aber nicht vielmehr die Ähnlichkeit mancher Plasmodesmengruppen mit den Spindelfiguren bei der Zellteilung darauf hin, daß die Plasmodesmen Reste der Spindelfasern darstellten, also bereits in der Zellplatte vorhanden waren und sich hier nur dem Nachweis entzogen (TANGL 1879, RUSSOW 1883, GARDINGER 1900)?

Die Annahme einer Anlage von Plasmaverbindungen schon bei der Zellteilung reicht jedoch nicht in allen Fällen aus, den Ursprung der Plasmodesmen zu erklären. Wird doch oft nur die Querwand neu eingezogen, während die Längswände der Tochterzellen aus den gedehnten Längswänden der Mutterzellen hervorgehen. Folgen dabei viele Querteilungen aufeinander — wie in den Rippenmeristemen (SCHÜEPP 1926) mancher Sprosse und Wurzeln —, so wachsen die Längswände auf ein Vielfaches ihrer ursprünglichen Größe heran und sollten dabei an Plasmodesmen verarmen. Da solche Wände trotzdem ebenso reich an Plasmaverbindungen sind wie die Querwände, müssen Plasmodesmen hier unabhängig von der Zellteilung entstehen können, sei es, daß die vorhandenen Fäden geteilt (RUSSOW 1883, PRIESTLEY 1931, WARDROP 1954), sei es, daß neue vom Plasma aus in die Wand getrieben werden (STRASBURGER 1901).

Eine experimentelle Klärung dieser Fragen war lichtmikroskopisch wegen der Feinheit der Plasmodesmen ausgeschlossen; erst durch das Elektronenmikroskop mit seiner 100× größeren Auflösung schien sie möglich zu werden. So zeigten sich bei der elektronenoptischen Durchstrahlung von macerierten Zellwänden in den Tüpfelschließhäuten mancher Pflanzen Poren, die offenbar den Durchtrittsstellen der Plasmodesmen entsprachen (HUBER und KOLBE 1948, ROELOFSEN und HOUWINK 1951, MERICLE und WHALEY 1953, VOLTZ 1952, SCOTT, HAMNER, BAKER und BOWLER 1956, BÖHMER 1957, FREY-WYSSLING und MÜLLER 1957).

Die die Kanäle ausfüllenden Plasmaverbindungen selbst wurden von BUVAT (1957), HODGE, MARTIN und MORTON (1957) und STRUGGER (1957a) erstmalig im Dünnschnitt beobachtet und seither in beinahe

allen Arbeiten über pflanzliche Gewebe abgebildet (z. B. HEITZ 1957 a und b, SITTE 1958, PERNER 1958, SETTERFIELD, STERN und JOHNSTON 1959).

Es sind feine Brücken, die benachbarte Protoplasten durch die Wand hindurch kontinuierlich miteinander verbinden und sogar gewisse Elemente des Binnenplasmas enthalten sollen (BUVAT 1957, 1960, STRUGGER 1957a). Die plasmatische Natur der Zellbrücken scheint dadurch endgültig gesichert zu sein.

Da bisher nahezu alle Aufnahmen von meristematischen Geweben stammen, kann heute nicht mehr am Vorkommen von Plasmodesmen schon in primären Wänden gezweifelt werden, auch wenn sie lichtmikroskopisch zu diesem Zeitpunkt noch nicht dargestellt werden können.

Elektronenoptische Aufnahmen von BUVAT und PUISSANT (1958) deuten sogar darauf hin, daß sie bereits zwischen den Phragmoplastenvacuolen in der Zellplatte vorhanden sind, was eine primäre Anlage bei der Zellteilung wahrscheinlich macht. Über eine sekundäre Vermehrung von Plasmodesmen in Wänden, die nicht neugebildet werden, sondern durch Streckung aus vorhandenen hervorgehen, ist dagegen bis heute noch nichts bekannt. Wegen der Schwierigkeit, ältere Pflanzenzellen für elektronenoptische Studien zu fixieren, wurde bisher auch die weitere Differenzierung der meristematischen Plasmodesmen zu den zweifellos gröberen, bereits lichtmikroskopisch sichtbaren Zellbrücken erwachsener Gewebe noch nicht elektronenmikroskopisch untersucht.

Diese Lücken zu schließen, war das Ziel der vorliegenden Arbeit: Es sollte die Entwicklung der Plasmodesmen vom Meristem über das Teilungs-, Streckungs- und Dickenwachstum der Wand bis zum fertigen Gewebe verfolgt werden, um so vielleicht die Grundlage auch für die Deutung der physiologischen Funktionen dieser wichtigen Gebilde zu gewinnen.

Die Untersuchungen wurden im Botanischen Institut der Universität Bonn in den Jahren 1956—1960 durchgeführt.

Meinem hochverehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. W. SCHUMACHER, sei für die Anregung zu dieser Arbeit, seine stete Anteilnahme und Hilfsbereitschaft herzlich gedankt.

B. Methodik

Als Versuchspflanze diente *Viscum album* auf *Malus floribunda*, *Acer tataricum* und *Crataegus fecunda* aus dem Botanischen Garten der Universität Bonn.

Die Plasmodesmenentwicklung wurde an der primären Rinde wachsender Internodien verfolgt, für das Studium des Plasmodesmenfeinbaues wurden außerdem Blütenanlagen und Embryonen herangezogen.

I. Lichtmikroskopische Methoden

1. Plasmodesmenfärbungen. Bei den vorliegenden Untersuchungen bewährte sich vor allem wieder das alte Meyersche (1897) Jod-Pyoktanin-Verfahren, das

sich besonders in der Variation von JOHANSEN (1940) als einfach, zuverlässig und allgemein anwendbar erwies.

2. Wandfärbungen. Um das Tüpfelmuster der Wände sichtbar zu machen, wurden dünne Gefrierschnitte durch das Gewebe 5 min in einer 0,5%igen Kristallviolettlösung gefärbt und nach Auswaschen in Leitungswasser sofort in Wasser untersucht. Im Grünlicht betrachtet erscheinen bei den so behandelten Geweben die Tüpfel hell in leuchtend rot-violetten Wänden. Die Färbung gibt die gleichen Bilder wie die gewöhnlich angewendete Schleidensche (1838) Jod-Schwefelsäure-Methode, hat aber den Vorteil, die Wände nicht durch Quellung zu verändern. Zur Bestimmung der Tüpfelmaße wurden Mikrophotographien der Präparate (Zeiss Kursmikroskop, Objektiv 40×, A = 0,58, Photookular 12×, Exakta Varex, Kamerafaktor 0,4) auf Millimeterpapier übertragen und die Tüpfelfläche durch Auszählen ermittelt.

II. Elektronenmikroskopische Methoden

Alle Gewebe wurden sofort nach der Entnahme in Handschnitte zerlegt und vom Messer weg in einem Osmiumsäure-Bichromat-Gemisch nach WOHLFARTH-BOTTERMANN (1957) fixiert. Die Entwässerung wurde mit Alkohol durchgeführt. Die niedrigste Alkoholkonzentration enthielt dabei als Kontrastierungsmittel 1% Phosphorwolframsäure und $^1/_2$% Uranylacetat nach WOHLFARTH-BOTTERMANN (1957). Die Einbettung erfolgte in Methacrylat. Die Dünnschnitte wurden auf einem Ultramikrotom nach SITTE[1] und einem Servall „Porter-Blum"-Mikrotom[2] angefertigt. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden mit dem Akashi Tronscope Modell TRS-50[2, 3] bei 50 kV, 10—20 mA Strahlstrom und 50 μ Blenden hergestellt, mit Ausnahme von Abb. 4a, die mit einem Siemens Übermikroskop ÜM 100d bei 80 kV[1] aufgenommen wurde.

C. Die Entwicklung der Plasmodesmen im Rindenparenchym von *Viscum album*

Das gabelig verzweigte Sproßsystem von *Viscum* kommt folgendermaßen zustande: Jeder Trieb bildet während der Vegetationsperiode nur ein Internodium, das am oberen Ende 2 Laubblätter trägt und mit einer zwischen diesen stehenden Blüte abschließt. Im nächsten Jahr wird die Verzweigung von 2 Seitenästen fortgesetzt, die aus den Achseln der Laubblätter hervorbrechen und sich zu je einem neuen Internodium entwickeln.

---

[1] Herrn Priv.-Doz. Dr. K.E. WOHLFARTH-BOTTERMANN danke ich für die Erlaubnis, im Zentrallaboratorium für Angewandte Übermikroskopie der Universität Bonn das Sitte-Mikrotom und das Siemens Übermikroskop ÜM 100d benutzen zu dürfen, sowie für seine Beratung bei der Präparation. Frau K. JOPPEN sei für die Anfertigung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen am Siemens ÜM 100d gedankt.

[2] Die Deutsche Forschungsgemeinschaft stellte dankenswerterweise das „Porter-Blum"-Mikrotom und das Akashi-Mikroskop zur Verfügung.

[3] An dieser Stelle sei aber auch der Firma Akashi Seisakusho, Ltd., Tokyo, insbesondere Herrn H. TOCHIGI, Chief Engineer of E.M. Section Research Dept. Akashi Seisakusho, Ltd., Tokyo, für die Einweisung in die Bedienung des Tronscope herzlich gedankt.

I. Teilungswachstum

Während der junge Zweig von etwa 1 mm auf etwa 30 mm Länge heranwächst, wird das Rindenparenchym von einem Rippenmeristem (SCHÜEPP 1926) aufgebaut (Abb. 1):

Alle Rindenzellen strecken sich gleichzeitig in Richtung der Sproßachse in die Höhe, und sobald sie eine bestimmte Länge (maximal 30 μ) erreicht haben, teilen sie sich durch eine Querwand senkrecht zur Sproßachse in 2 Tochterzellen (Abb. 1 *B*, punktiert), die ihrerseits longitudinal auswachsen, transversal geteilt werden (Abb. 1 *C*, gestrichelt) usf. Es entstehen so longitudinale Zellreihen, die Rippen des Rippenmeristems (Abb. 1 *C* zeigt eine solche Rippe).

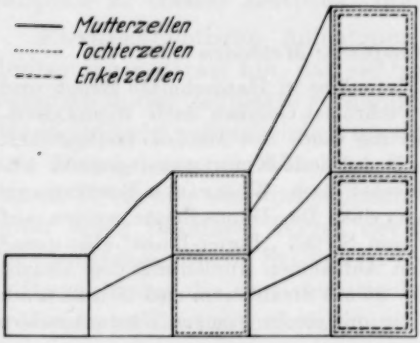


Abb. 1. Das Teilungswachstum im Rippenmeristem (SCHÜEPP 1926). Schematisch

Zu diesem Zeitpunkt sollte es möglich sein, die primäre und sekundäre Entstehung der Plasmodesmen zu beqbachten. Denn einerseits müssen in den frisch eingezogenen Querwänden[1] Plasmodesmen primär neugebildet werden, andererseits sind wiederholte Querteilungen natürlich mit einer starken Streckung der Längswände[1] verbunden, und wenn die Zahl der Plasmafäden nicht mit jedem Teilungsschritt auf die Hälfte absinken soll, so müssen die Plasmodesmen hier sekundär vermehrt werden.

1. Querwände. *a) Tüpfelmuster.* Die neu eingezogenen Querwände im Rippenmeristem von *Viscum* zeigen zunächst noch keine klar abgegrenzten Tüpfel. Sie sind außerordentlich zart, nur von einem spinnwebartig feinen Netz aus mit Kristallviolett färbbarer Substanz überzogen (Abb. 2a). Solche Membranen sind allerdings selten, sie werden offenbar frühzeitig verstärkt. Meist sind die Querwände dann von einem gröberen und dichteren Maschenwerk bedeckt, das aber noch immer zahlreiche weitere und engere Stellen zwischen sich frei läßt (Abb. 2b).

Ein netzartiger Bau junger Querwände wurde bereits von BARANETZKI (1886) für über 60 Gefäßpflanzenarten beschrieben und inzwischen mehrfach wiederentdeckt (TUPPER-CAREY und PRIESTLEY 1924 für *Vicia faba*; ZIEGENSPECK 1952, 1953 für *Vicia faba*, *Atropa belladonna* und *Humulus lupulus*).

SCOTT und LEWIS (1953, bei *Vicia faba*, *Sechium edule* und *Zea mays*) und WHALEY, MERICLE und HEIMSCH (1952, bei *Zea mays*) fanden dagegen die jüngsten Querwände siebartig gebaut mit zahlreichen kleinen, runden Tüpfeln.

[1] In den folgenden Ausführungen werden die in Richtung der Sproßachse orientierten Radial- und Tangentialwände als „Längswände", die senkrecht zur Sproßachse stehenden Radialwände als „Querwände" bezeichnet.

b) Plasmodesmen. In den neugebildeten Querwänden des Rippenmeristems müssen die Plasmaverbindungen primär entstehen. Zu welchem Zeitpunkt dies geschieht, ist noch nicht geklärt.

Im lockeren Fibrillengeflecht macerierter junger Zellwände von *Cucurbita*-Internodien konnten FREY-WYSSLING und MÜLLER (1957) elektronenmikroskopisch keine Plasmodesmenporen erkennen. Sie schlossen daraus, daß Plasmodesmen den jüngsten Wänden möglicherweise fehlen und erst nachträglich angelegt werden: Bei der Verdickung

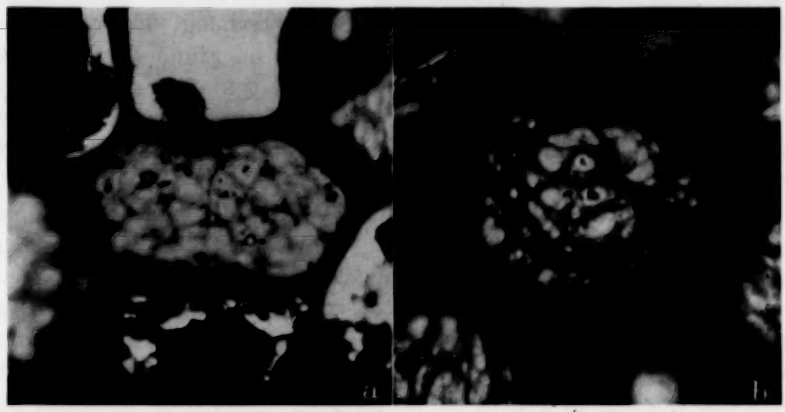


Abb. 2a u. b. Rippenmeristem aus der Rinde eines Sprosses von *Viscum album*. Tüpfelmuster der Querwände in Flächenansicht. a Neu eingezogene Querwand, b etwas ältere Querwand. Lichtoptisch 750 ×

der Membran soll das Plasma an einigen Stellen mit der Cellulosesynthese aufhören, während es ringsum weiter Wandsubstanz ablagert. Auf diese Weise wird ein Plasmapfropf in der Membran eingeschlossen, der mit einem entsprechenden der Gegenseite eine Plasmaverbindung bildet. Die trennende Mittellamelle soll dabei vielleicht erhalten bleiben, trotzdem aber einen engen Kontakt der benachbarten Protoplasten gestatten.

Im Gegensatz dazu sollen nach BUVAT und PUISSANT (1958) die Plasmodesmenkanäle schon bei der Anlage der Zellplatte während der Zellteilung ausgespart werden: Sie beobachteten im Dünnschnitt an fixiertem Gewebe im Wurzelmeristem von *Allium cepa* zwischen den zusammenfließenden Phragmoplastenvacuolen ergastoplasmahaltige Stränge, die sie als künftige Plasmodesmen deuteten.

In den vorliegenden Untersuchungen gelang es nicht, die Bildung der Zellplatte im Elektronenmikroskop zu verfolgen. Ob die Plasmodesmen in den Querwänden der *Viscum*rinde unmittelbar bei der Zellteilung oder erst später entstehen, muß also leider offengelassen werden.

Doch finden sich Plasmodesmen schon in den jüngsten meristematischen Wänden (vgl. STRUGGER 1957a und b, HODGE, MARTIN und MORTON 1957, HEITZ 1957a und b, PERNER 1958, SITTE 1958).

Einzeln oder in Gruppen durchziehen sie die Membran als einfache, unverzweigte, 0,1—0,5 μ lange Fäden von nur 150—300 Å Durchmesser (vgl. Abb. 8, S. 617). Über die submikroskopische Feinstruktur dieser Plasmodesmen wird in Kapitel E, S. 616 berichtet. Sie hängen auf beiden Seiten der Wand mit dem Zellplasma unmittelbar zusammen und zeigen — abgesehen von offenkundigen Anschnitten — in keinem Fall in der Mittellamelle der Zellwand eine Unterbrechung. Es besteht also kein Grund, die Plasmodesmen von *Viscum* im Sinne der Schweizer Autoren als nachträgliche Aussparungen in den primären Verdickungsschichten beidseitig der Mittellamelle aufzufassen. Ihr regelmäßiges Vorkommen schon in den jüngsten Membranen macht eher eine primäre Entstehung bei der Zellteilung wahrscheinlich.

Der scheinbare Widerspruch zwischen den Beobachtungen am Macerationspräparat (Fehlen von Plasmodesmenporen) und am Dünnschnitt (Plasmodesmen zwischen den Phragmoplastenvacuolen) wird erklärlich, wenn man bedenkt, daß die bisher beschriebenen meristematischen Plasmodesmen nicht dicker als 500 Å sind (STRUGGER 1957a, HODGE, MARTIN und MORTON 1957, HEITZ 1957a und b, PERNER 1958, SITTE 1958), die Lücken im Fibrillennetz der neugebildeten Membranen aber über 1000 Å weit sein sollen (FREY-WYSSLING 1959). Selbst wenn man eine eventuelle Schrumpfung durch die Präparation berücksichtigt (STRUGGER 1957b), könnten die feinen Plasmafädchen die bei der Maceration gelöste Matrix durchziehen, ohne eine erkennbare Spur im Fibrillenmuster zu hinterlassen.

2. Längswände. *a) Tüpfelmuster.* Im Rippenmeristem der 1 bis 30 mm langen *Viscum*sprosse sind die Längswände verhältnismäßig dick (etwa 2 μ) und im Gegensatz zu den Querwänden deutlich getüpfelt. Die Tüpfel sind in den Berührungsflächen zwischen 2 Zellen in senkrechten Längsbändern angeordnet, die mit ungetüpfelten, an die Intercellularen angrenzenden Membranstreifen abwechseln.

Wie oben geschildert, werden die Rindenzellen während des Austriebs in rascher Folge quergeteilt, wobei die Längswände auf ein Vielfaches ihrer ursprünglichen Größe heranwachsen. Es fragt sich, wie dabei die Tüpfel der Mutterzellen auf die Tochter- und Enkelzellen verteilt werden.

Falls die Tüpfel in wachsenden Zellwänden nicht vermehrt werden (FREY-WYSSLING 1959), müßte ihre Zahl pro Zelle mit jedem Teilungsschritt absinken. Nach WILSON (1957, 1958) nimmt jedoch die Tüpfelzahl pro Zelle bei *Elodea canadensis* und *Hippuris vulgaris* während des Teilungswachstums nicht ab. Auch bei *Viscum* ist in den getüpfelten Wandstreifen der Längswände die Tüpfelfläche, bezogen auf 100 μ^2

Wandfläche, konstant: Sie beträgt sowohl im 1 mm-, als auch im 2-, 4-, 8-, 15- und 30 mm-Sproß stets etwa 30%. Die Tüpfelfläche muß also während der Streckung der Membran in gleichem Maße vergrößert werden wie die übrige Wandfläche.

Eine Tüpfelvermehrung ist auf verschiedene Weise denkbar:

Vorausgesetzt, daß die Tüpfel sich nicht an der Streckung der Wand beteiligen (FREY-WYSSLING 1959), ist die Zunahme der Tüpfelfläche nur durch eine Neubildung von Tüpfeln zwischen den durch die Membrandehnung auseinanderrückenden alten Tüpfeln zu erklären. Eine nachträgliche Anlage von Tüpfeln ist aber nach FREY-WYSSLING (1959) in embryonalen Wänden nicht ungewöhnlich,

Abb. 3a—c. Rippenmeristem aus der Rinde eines Sprosses von *Viscum album*. Tüpfelmuster der Längswände in Flächenansicht. a Zu Beginn des Teilungswachstums, b und c während des Teilungswachstums. Lichtoptisch 750 ×

sollen doch alle Tüpfel erst sekundär durch eine lokale Aufsprengung des ursprünglich homogenen Fibrillengeflechtes der Primärwand entstehen. Leider fehlen Angaben darüber, ob derartige Auflockerungen auch im Gerüst sich streckender Membranen zwischen bereits vorhandenen Tüpfeln beobachtet worden sind.

Um die Tüpfelvermehrung zu erklären, braucht man jedoch nicht unbedingt eine Neubildung anzunehmen. Lichtmikroskopische Beobachtungen deuten vielmehr darauf hin, daß bei der Streckung der Wand während des Teilungswachstums auch die Tüpfel heranwachsen und sich teilen können (ZIEGENSPECK 1952, 1953 für *Vicia faba*-Wurzeln, *Atropa belladonna* und *Humulus lupulus*-Schößlinge; SCOTT und LEWIS 1953 für Sproß- und Wurzelspitzen von *Ricinus communis*, *Sechium edule*, *Vicia faba* und *Zea mays*).

Auch bei *Viscum* werden die Tüpfel in den Längswänden des Rippenmeristems der Rinde offenbar durch Teilung vermehrt:

Während nämlich die Zellen des Rindenparenchyms im 1 mm langen Sproß, also vor der Hauptstreckung, einfache, runde Tüpfel von etwa 5—7 μ^2 Fläche haben (Abb. 3a), finden sich bei den im Teilungswachstum begriffenen Sprößchen 2 Arten von Tüpfeln:

1. Große, rundliche Tüpfel von mindestens 5 μ^2, meist um 25 μ^2, im Extrem sogar über 60 μ^2 Fläche. Die Schließhaut dieser Tüpfel ist durch vorwiegend transversal verlaufende Balken in schmale Felder unterteilt (Abb. 3b).

2. Kleine, schmal lanzettliche, transversal gestreckte bis rundliche Tüpfel von nur 1 μ^2 bis höchstens 10 μ^2, meist um 5 μ^2 Fläche mit

nichtunterteilter Schließhaut. Während die großen Tüpfel mehr oder weniger entfernt voneinander in der Wand liegen, stehen die kleinen vielfach eng benachbart zusammen, derart, daß sie eine Gruppe bilden, die im Umriß einem großen Tüpfel ähnelt (Abb. 3c).

Offenbar besteht folgender Zusammenhang zwischen den verschiedenen Tüpfeltypen: Die vor dem Austrieb vorhandenen kleinen, ungeteilten Tüpfel wachsen bei der Streckung der Längswände während des Teilungswachstums zu großen Tüpfeln heran, nehmen also ebenfalls an Fläche zu. Sobald sie eine gewisse Ausdehnung erreicht haben, wird ihre Schließhaut durch quer darübergelegte Verstärkungsleisten in mehrere kleine Felder unterteilt. Beim weiteren Wachstum verbreitern sich die trennenden Balken immer mehr, so daß die Felder auseinanderrücken und schließlich zu selbständigen Tüpfeln werden. Jeder dieser neugebildeten kleinen Tüpfel wächst nun wieder zu einem großen heran, unterteilt sich, zerfällt usf.

b) Plasmodesmen. Im Rippenmeristem der *Viscum*rinde werden also in den Längswänden die Tüpfel durch Flächenwachstum der Schließhäute und Teilung laufend vermehrt. Es fragt sich, wie sich dies auf die Plasmodesmen in ihnen auswirkt.

Wenn die Zahl der Plasmodesmen im Tüpfel nicht mit jedem Teilungsschritt abnehmen und sich rasch Null nähern soll, so muß man auch für sie eine Vermehrung annehmen. Auf welche Weise die Zahl der Plasmodesmen vervielfältigt wird, ob zwischen den alten Fäden zusätzliche aus dem Plasma in die Wand einwachsen oder ob die vorhandenen in mehrere neue aufgespalten werden können, wurde seit STRASBURGER (1901) wiederholt diskutiert (Literatur bei MEEUSE 1957), aber noch in keinem Fall wirklich beobachtet.

Eine lichtmikroskopische Lösung dieser Frage ist natürlich wegen der Feinheit der Plasmafäden unmöglich, aber auch elektronenmikroskopische Untersuchungen brachten bisher keine Klarheit: Im Dünnschnitt wurde die Entwicklung der Längswandplasmodesmen noch nicht verfolgt, und im Macerationspräparat ist nur zu erkennen, daß die Tüpfel wachsender Wände von einem lockeren Fibrillengeflecht bedeckt sind, was keinen Rückschluß auf eine eventuelle Plasmodesmenvermehrung erlaubt (SCOTT, HAMNER, BAKER und BOWLER 1956, BÖHMER 1957).

FREY-WYSSLING (1959) beschreibt lediglich einen komplizierten Weg, auf dem die Plasmodesmen in Längswänden primär entstehen sollen: In den jüngsten Wänden fand er eine homogene Streuungstextur der Cellulosefibrillen ohne Plasmodesmenporen. Sie sollen daher plasmodesmenfrei sein. Warum dieser Schluß nicht zwingend ist, wurde bereits oben besprochen. Die älteren Membranen zeigen große Lockerstellen im Fibrillengeflecht, die dadurch zustande kommen sollen, daß Plasmaauswüchse die Mikrofibrillen auseinanderdrängen und auf diese Weise Kontakt mit dem Nachbarplasma suchen. Wird der Kontakt mit einer entsprechenden plasmatischen Protuberanz der Gegenseite hergestellt, so soll aus der Berührungsstelle ein Tüpfel entstehen, der durch nachträglich eingeflochtene Fibrillenbündel in mehrere Plasmakanäle aufgeteilt wird. Damit soll die Tüpfel-

entwicklung abgeschlossen und das weitere Wandwachstum auf die Zwischentüpfelpartien beschränkt sein.

In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, die Entwicklung der Plasmodesmen während der Tüpfelteilung am fixierten Gewebe zu studieren. Dabei ergab sich folgendes Bild:

Die 1—$1^1/_2\,\mu$ dicken Längswände besitzen tief eingeschnittene, je nach Schnittführung verschieden lange Tüpfel mit 1000—5000 Å dicken Schließhäuten. Plasmodesmen finden sich nur in den Tüpfeln (aggregierte Plasmodesmen im Sinne KOHLs 1900), sie bieten einen unerwarteten Anblick.

Abb. 4 möge davon einen Eindruck vermitteln.

Sie zeigt eine Tüpfelschließhaut in einer Längswand aus einer Rindenzelle eines etwa 5 mm langen Sprosses. Wie die beigefügte schematische Zeichnung (Abb. 4b) erkennen läßt, dürften die mittleren Wandpartien (Abb. 4b *A*) der Primärwand, die äußeren (Abb. 4b *B*) den sekundären Wandschichten entsprechen. Auf diese wird jedoch erst in Kapitel C IV, S. 614, näher eingegangen werden.

Während die Plasmodesmen der neu eingezogenen Querwände, wie beschrieben, einfachen Fäden gleichen, die auf dem kürzesten Wege die Membran durchziehen, sieht man in den Tüpfeln der Längswände in der Mitte der Schließhaut größere, durch OsO_4 dunkel gefärbte, offenbar plasmatische Massen, von denen nach beiden Seiten mehrere Fäden ausstrahlen.

Die weitere Verzweigung einzelner Fäden in Abb. 4a (Pfeile) liegt wohl außerhalb der nicht scharf erkennbaren Membranbegrenzung und entsteht vermutlich erst bei der Präparation: Während der Entwässerung und Einbettung schrumpft der Protoplast und weicht etwas von der Wand zurück. Die in die Plasmodesmen einmündenden Plasmateile bleiben dabei an den Zellbrücken haften und werden ein wenig aus dem übrigen Plasma herausgezogen. Sie sind aber ein schöner Beweis für die Kontinuität zwischen Binnenplasma und Plasmodesmen.

Im Längsschnitt wurden in einer Tüpfelschließhaut in mehr oder weniger großer Entfernung voneinander bis zu 5 derartige Zellbrücken getroffen, die verschieden stark verzweigt sein können. Bei manchen ist der Plasmaknoten in der Mittellamelle bis zu 6000 Å lang, 1000 bis 2000 Å dick und ebenso breit und nimmt bis zu 8 Plasmafäden von jeder Seite in sich auf. Bei anderen dagegen ist er mehr kugelig mit 1000—2000 Å Durchmesser und entsendet beidseitig nur 1—3 Fäden. Die Ränder der Mittelknoten sind vielfach nicht glatt, sondern unregelmäßig in der Wand ausgefranst, auch stehen sie oft so dicht zusammen, daß sie sich seitlich berühren.

Eine derart unerwartete und bisher noch nie beobachtete Struktur erweckt natürlich den Verdacht, künstlich während der Präparation entstanden zu sein. Es ist jedoch schwer denkbar, wie in mehreren 100 Schnitten von den verschiedensten Fixierungen stets die gleichen Kunstprodukte in den Längswänden derselben Zellen auftreten sollen,

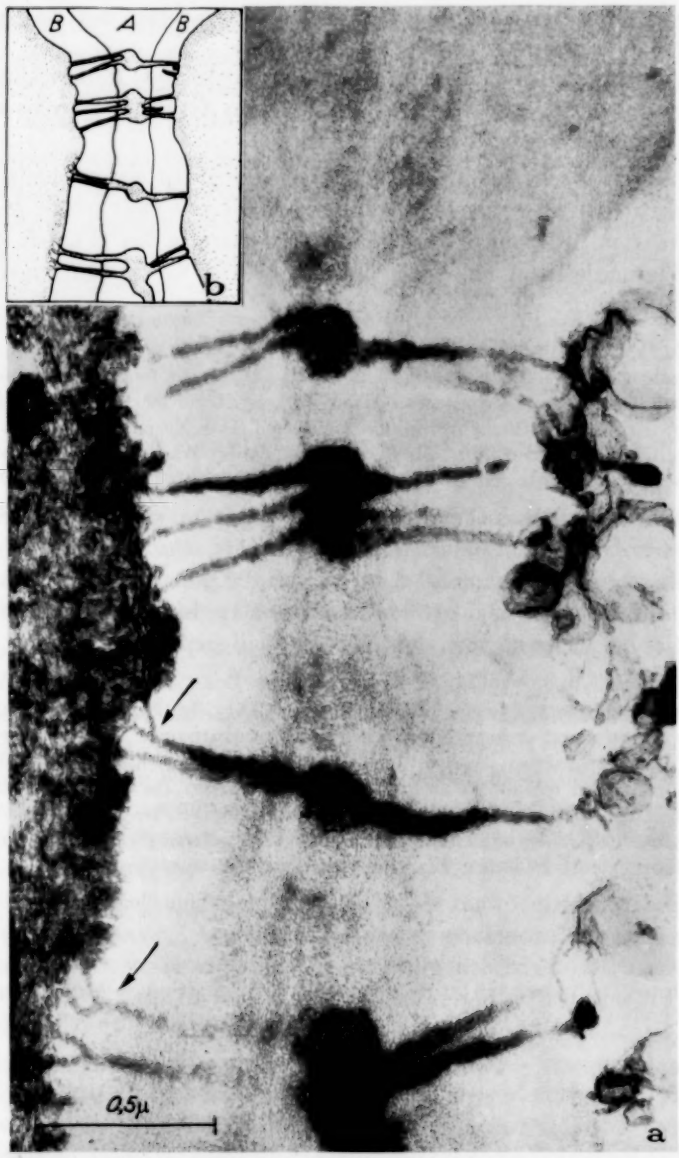


Abb. 4a u. b. *Viscum album*, Längswand einer Rindenzelle aus einem 5 cm langen Sproß, Längsschnitt durch eine Tüpfelschließhaut. a Verzweigte Plasmodesmen mit Mittelknoten. Pfeil: „sekundäre Verzweigung" außerhalb der Wand. Elektronenoptisch (Siemens ÜM 100 d), Vergr. prim. 10600 ×, Endvergr. 48000 ×. b Schematische Zeichnung nach a. *A* Primärwand; *B* sekundäre Verdickungsschichten der Wand

die in ihren Querwänden „normale" Plasmodesmen ohne diese Mittelknoten zeigen. Für die reale plasmatische Natur der verzweigten Plasmodesmen sprechen außerdem folgende Überlegungen:

1. Sie sind stark osmiophil, ähneln also im elektronenoptischen Kontrast dem Binnenplasma.

2. Sie zeigen die gleiche Substruktur wie die Querwandplasmodesmen (s. Kapitel E, S. 616).

3. Sie hängen unmittelbar mit dem Plasma zusammen, worauf besonders die obenerwähnten sekundären Verzweigungen hinweisen.

Das Auftreten von großen, die Grenze der Sichtbarkeit im Lichtmikroskop erreichenden Massen in der Wandmitte ist insofern nicht überraschend, wenn man bedenkt, daß knotenartige Anschwellungen der Plasmodesmen in der Mittellamelle, sog. Mittelknoten, auch lichtmikroskopisch schon vielfach beobachtet worden sind, unter anderem in der *Viscum*rinde bereits von KUHLA (1900). Allerdings wurden diese Mittelknoten übereinstimmend als Artefakte gedeutet (KOHL 1900, STRASBURGER 1901, MEYER 1920, MÜHLDORF 1937, MEEUSE 1957): Man vermutete, daß die Plasmodesmen durch die für die lichtmikroskopische Darstellung notwendige Quellung der Wand in die Länge gestreckt und damit dünner würden. In der schwächer quellenden Mittellamelle sollte der Plasmafaden seine ursprüngliche Dicke behalten und als Knoten in Erscheinung treten.

Betrachtet man einen mit Jod-Pyoktanin gefärbten Schnitt durch das Rippenmeristem von *Viscum* im Lichtmikroskop, so erkennt man in den Schließhäuten der Längswände tatsächlich diese Mittelknoten. Da bei den Plasmodesmen der Querwände bei gleicher Behandlung keine derartigen Anschwellungen sichtbar sind, liegt der Schluß nahe, daß den Mittelknoten der Lichtmikroskopie die elektronenmikroskopisch aufgefundenen, ebenfalls nur in den Längswänden beobachteten Mittelknoten der verzweigten Plasmodesmen entsprechen. Sie sollen daher hier weiterhin einfach als Mittelknoten bezeichnet werden.

Selbst wenn man die Schrumpfung der Membran durch die Alkoholentwässerung berücksichtigt, reichen aber Quellungsdifferenzen in den verschiedenen Schichten der Wand zur Deutung dieser elektronenmikroskopisch darstellbaren Mittelknoten nicht aus:

Eine besonders starke Entquellung der Mittellamelle könnte zwar eine gewisse Stauchung der Plasmodesmen in der Wandmitte zur Folge haben, doch geht die Breite der Knoten über das zu erwartende Maß hinaus. Auch eine Aufspaltung des Mittelknotens in viele feine, lichtmikroskopisch begreiflicherweise nicht sichtbare Fäden ist nicht durch Quellungsunterschiede zu erklären.

Auffällig ist dagegen die weitgehende Beschränkung der knotenbesitzenden Plasmodesmen auf die Längswände. Während die von einfachen Plasmodesmen durchzogenen Querwände im Rippenmeristem keine wesentliche Dehnung erleiden (über eine gewisse Dehnung in der späteren Entwicklung mit dem Auftreten kleiner Knoten s. Kapitel C III, S. 612), werden die Längswände auf ein Vielfaches ihrer ursprünglichen

Größe gestreckt. Es liegt daher nahe, einen Zusammenhang zwischen dem Vorkommen von Mittelknoten und dem Streckungswachstum der Wände zu vermuten.

Wie oben gezeigt wurde, teilen sich im Laufe der Streckung der Längswände die Tüpfel, wobei eine Vermehrung der Plasmodesmen stattfinden muß, sei es durch Einwachsen neuer Plasmaverbindungen in die Schließhaut, sei es durch Teilung der vorhandenen Plasmodesmen. Da von mehreren 100 Bildern keines auf ein neues Eindringen von Plasmafortsätzen in die Wand hinwies, darf man vermuten, daß bei *Viscum* der 2. Weg eingeschlagen wird. Die Aufspaltung der knotenbesitzenden Plasmodesmen könnte dann vielleicht als Plasmodesmenteilung gedeutet werden.

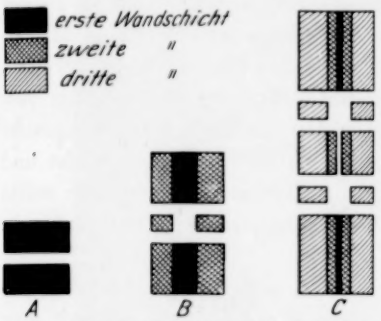


Abb. 5. Plasmodesmenvermehrung beim Multinetzwachstum. Schematisch

Freilich entspricht das Bild der stark verzweigten Plasmodesmen mit ihren langen Mittelknoten kaum den theoretischen Vorstellungen, die man sich bisher von einer solchen eventuellen Plasmodesmenteilung machte. Danach sollte nämlich der Plasmafaden zunächst auf seinen doppelten Umfang heranwachsen, um sich dann durch Zwischenlagerung von Cellulose glatt in 2 neue Fäden durchzutrennen (RUSSOW 1883, STRASBURGER 1901). Die Bildung verzweigter Plasmodesmen mit breiten Mittelknoten wäre dabei nur so zu verstehen, daß die Abscheidung von Wandsubstanz an diesen lokalen Stellen aus irgendeinem Grunde zeitweilig unterbleibt.

Diese Überlegungen gehen jedoch von einem Intussuszeptionswachstum der Wand aus, während für das Teilungswachstum heute meist ein Häutungswachstum nach dem Multinetztyp angenommen wird (ROELOFSEN 1959). Falls dieses auch für die Streckung der Tüpfelschließhäute gilt, ließe sich das Auftreten verzweigter, knotenbesitzender Plasmodesmenvermehrungsstadien vielleicht folgendermaßen erklären (Abb. 5):

Durch die Zellteilung wird die Mutterzelle zunächst halbiert, jede der Tochterzellen wächst aber anschließend wieder auf die Größe der Mutterzelle heran. Dabei dehnt der Protoplast die zu eng gewordene Membran (Abb. 5 *A*, erste Wandschicht) in senkrechter Richtung, sie wird dünner, ihr Fibrillengeflecht lockerer. Die Plasmodesmenkanäle in der Wand werden dadurch verkürzt, gleichzeitig aber erweitert (Abb. 5 *B*, erste Wandschicht).

Um den Verlust an Festigkeit durch die Membrandehnung auszugleichen, lagert die gestreckte Zelle sofort durch Apposition eine neue

Haut auf die alte ab. Diese Wandschicht ist wieder dichtmaschig und teilt den erweiterten Plasmodesmenkanal in 2 oder 3 Kanäle mit kleinerem Durchmesser auf (Abb. 5 *B*, zweite Wandschicht). Auf diese Weise entstehen verzweigte Plasmodesmen, deren Mittelknoten den gedehnten Plasmodesmen in der alten Membran, deren Verzweigungen den neugebildeten Fäden in der jüngsten Wandschicht entsprechen (Abb. 5 *B*).

Während der folgenden Wandstreckung werden nicht nur die Mittelknoten, sondern auch die Plasmafäden gedehnt und in die Länge gezogen und durch die gleichzeitig abgeschiedene neue Plasmahaut (Abb. 5 *C*, dritte Wandschicht) in mehrere schmale Stränge aufgespalten. Es kommen so vielfach verzweigte Plasmodesmen zustande, deren Mittelknoten Dünnstellen und Verdickungen aufweisen. Tatsächlich werden solche „perlschnurartigen" Mittelknoten oft beobachtet. Wiederholt sich der Vorgang mehrmals, so werden die innersten Plasmaschichten überdehnt und zerreißen, der große, reich verzweigte Plasmodesmenkomplex zerfällt in mehrere Teilstücke, die bei der Tüpfelteilung auf verschiedene Tüpfel verteilt werden und wieder zu großen Plasmodesmen auswachsen können. Diese Vorstellung stimmt damit überein, daß bei *Viscum* häufig Gruppen dicht benachbarter Plasmodesmen auftreten, deren Knoten am Rande unregelmäßig ausgefranst sind und einander beinahe berühren. Derartige Gruppen könnten gut aus einem großen Komplex durch Zerfall hervorgegangen sein.

Es fragt sich, ob eine solche Plasmodesmenbildung und -vermehrung allein für die Mistel gilt oder auch bei anderen Pflanzen vorkommt.

Die bisher veröffentlichten Aufnahmen von jungen, macerierten Tüpfeln bieten dafür vielleicht einen gewissen Hinweis: Sie zeigen vielfach in der Streuungstextur der Schließhäute zahlreiche rundlich elliptische Dünnstellen von 1000 bis mehrere 1000 Å Durchmesser (Scott, Hamner, Baker und Bowler 1956 für die Zwiebelwurzel, Böhmer 1957 für die *Avena*koleoptile), die von einem feinen Fibrillennetz überdeckt sind. Es liegt nahe, in den Dünnstellen den Sitz von Mittelknoten und in den Maschen des darüberliegenden Geflechtes die Durchtrittsstellen der Plasmafäden zu vermuten, um so mehr, als die Zahl der Mittelknoten pro Tüpfelfläche größenordnungsmäßig mit der der Dünnstellen übereinstimmt. Auch die von Frey-Wyssling und Stecher (1951) und Stecher (1952) beschriebenen Aufsprengungen im Fibrillennetz der Schließhäute bei Maiskeimwurzeln sind vielleicht nicht als nachträgliches Eindringen von Plasmaprotuberanzen in die Membran, sondern durch Knotenbildung der bereits in der Wand vorhandenen, im Macerationspräparat begreiflicherweise nicht sichtbaren Plasmodesmen zu erklären.

II. Streckungswachstum

Hat der junge *Viscum*trieb eine Länge von etwa 3 cm erreicht, so läßt die Teilungstätigkeit im Rindenparenchym nach. Die weitere Verlängerung der Sprosse auf die endgültige Größe von 5—6 cm kommt durch eine reine Streckung der Rindenzellen zustande, die von 12—25 μ auf 20—40 μ Länge heranwachsen, ohne weiter unterteilt zu werden.

Längswände. *a) Tüpfelmuster.* Gleichzeitig mit dem Aufhören der Zellteilungen kommt bei *Viscum* die Tüpfelvermehrung zum Stillstand. Bei der weiteren Streckung der Membranen rücken die Tüpfel durch die Vergrößerung der Zwischentüpfelpartien auseinander, ohne selbst an Fläche zuzunehmen (Abb. 6). Die Zahl der Tüpfel pro Zelle bleibt konstant (vgl. auch WARDROP 1955 für die *Avena*koleoptile und WILSON 1957, 1958 für *Elodea canadensis* und *Hippuris vulgaris*), bezogen auf

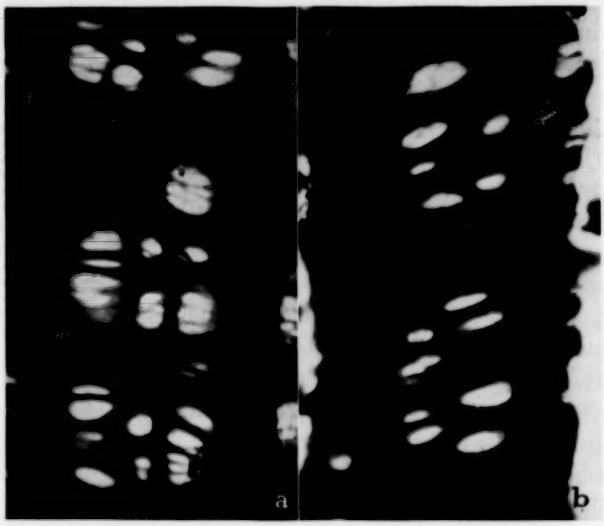


Abb. 6a u. b. *Viscum album*, Rindenzellen, Tüpfelmuster der Längswände beim Streckungswachstum. a Vor Beginn des Streckungswachstums, b während des Streckungswachstums. Lichtoptisch 750 ×

die Wandfläche nimmt die Tüpfelfläche jedoch ab. Sie beträgt im 5 cm-Sproß nur noch etwa 20% gegenüber etwa 30% vor Beginn der Streckung.

b) Plasmodesmen. Mit den Tüpfelteilungen hört auch die Plasmodesmenvermehrung auf. Die Entwicklung scheint dabei auf dem Stadium stehenzubleiben, das gegen Ende des Teilungswachstums gerade erreicht war: Man findet auch noch während des Streckungswachstums in den Tüpfeln großknotige, reich verzweigte und kleinknotige, wenig verzweigte Plasmodesmen.

III. Die Ausweitung der Rindenzellen in der Querachse

Während der junge *Viscum*sproß von etwa 1 mm auf etwa 50 mm Länge heranwächst, nimmt sein Umfang nur verhältnismäßig wenig zu (von etwa 4 mm auf etwa 7 mm). Dieser Dickenzuwachs wird großenteils durch die Leitbündel verursacht, deren Durchmesser sich im Laufe der Entwicklung verzweifacht. Die Rinde wird dabei nach außen geschoben und gedehnt. Sie fängt diese Dehnung zunächst durch eine

allseitige Weitung der Parenchymzellen auf (Verdopplung der Querschnittsfläche von etwa 1000 μ^2 auf etwa 2000 μ^2), gegen Ende des Wachstums kommen noch radiale Teilungen hinzu.

Im Rippenmeristem der *Viscum*rinde ist also neben der starken longitudinalen Streckung der Längswände auch mit einer geringen radialen und tangentialen Dehnung von Längs- und Querwänden senkrecht zur Sproßachse zu rechnen.

1. Querwände. *a) Tüpfelmuster.* Im Netzwerk der Querwände hinterläßt die Wanddehnung keine sichtbaren Spuren. Die zu erwartende Weitung der Maschen kann hier wahrscheinlich nicht in Erscheinung treten, da sie vom gleichzeitigen Dickenwachstum (Verdichtung des Geflechtes) überlagert wird.

b) Plasmodesmen. Wie in Kapitel C I, S. 602ff., geschildert, kann die Wanddehnung eine Vergrößerung der Plasmodesmenkanäle zur Folge haben. Es überrascht daher nicht, daß im Laufe der Ausweitung der Rindenzellen in älteren *Viscum*sprößchen auch bei den ursprünglich einfach fadenförmigen Querwandplasmodesmen tatsächlich kleinere Mittelknoten erscheinen.

Da die Streckung der Querwände aber weit geringer ist als bei den Längswänden, sind diese Knoten bezeichnenderweise sehr viel kleiner als die der Längswandplasmodesmen: Es sind rundliche Anschwellungen von nur etwa 800 Å Durchmesser gegenüber 1000—6000 Å in den Längswänden. Auch unterbleibt bei der Ablagerung neuer Wandschichten häufig die Aufspaltung in mehrere Äste, so daß sich in den Querwänden neben schwach verzweigten vorwiegend unverzweigte Plasmodesmen mit kleinen Mittelknoten finden.

Diese auffallende Übereinstimmung zwischen Größe der Mittelknoten und Ausmaß der Membrandehnung bestätigt aber erneut die Annahme, daß die Entstehung von Mittelknoten mit der Wandstreckung verknüpft ist.

2. Längswände. *a) Tüpfelmuster.* Während der Ausweitung der Rindenzellen werden die Längswände von etwa 20 auf etwa 25 μ, d.h. um $^1/_4$ ihrer ursprünglichen radialen und tangentialen Querausdehnung verbreitert. Dabei vergrößern sich sowohl die Fläche der getüpfelten als auch die der ungetüpfelten Wandstreifen, und es treten in den Tüpfeln außer Querteilungen Längsteilungen auf, durch die ein Tüpfel in mehrere nebeneinanderliegende zerlegt wird.

b) Plasmodesmen. Wie Querschnitte durch die Tüpfelschließhaut zeigen, sind die Mittelknoten nicht nur in Richtung der Sproßachse langgezogen, sondern auch seitlich verbreitert und in nebeneinanderliegende Fäden aufgespalten. Eine solche seitliche Verzweigung ist bei der Ausweitung der Zellen zu erwarten. Da die transversale Dehnung der Längswände, verglichen mit der starken longitudinalen Streckung,

nur gering ist, ist diese seitliche Verzweigung allerdings nicht so stark wie die Verzweigung in Richtung der Sproßachse (maximal 3 Plasmafäden pro Mittelknoten im Tüpfelquerschnitt gegenüber maximal 8 im Tüpfellängsschnitt).

IV. Sekundäre Verdickung der Wand

Noch während des Streckungswachstums beginnt die Verdickung der Längs- und Querwände durch Apposition auf etwa $2^1/_2\,\mu$.

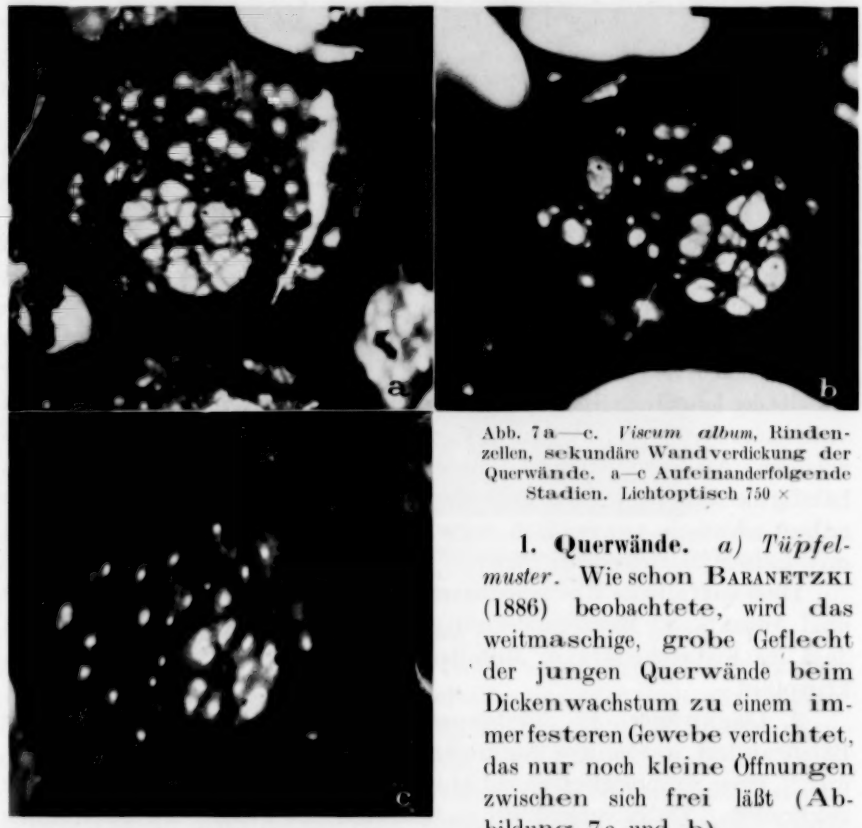


Abb. 7a—c. *Viscum album*, Rindenzellen, sekundäre Wandverdickung der Querwände. a—c Aufeinanderfolgende Stadien. Lichtoptisch 750 ×

1. Querwände. *a) Tüpfelmuster.* Wie schon BARANETZKI (1886) beobachtete, wird das weitmaschige, grobe Geflecht der jungen Querwände beim Dickenwachstum zu einem immer festeren Gewebe verdichtet, das nur noch kleine Öffnungen zwischen sich frei läßt (Abbildung 7a und b).

Bei den ausgewachsenen Membranen ist schließlich nichts mehr von dem ehemaligen Netzwerk zu erkennen, sie sind gleichmäßig dicht und besitzen statt unregelmäßiger Poren gut abgegrenzte, rundliche Tüpfel (Abb. 7c). Die Tüpfelfläche geht von 10—20% auf 5—10% der Wandfläche zurück.

b) Plasmodesmen. Während der sekundären Verdickung der Wand werden die Kanäle der Querwandplasmodesmen verlängert, ohne erkennbare weitere Veränderungen zu erfahren (vgl. FREY-WYSSLING und MÜLLER 1957).

2. Längswände. *a) Tüpfelmuster.* Das Tüpfelmuster der Längswände wird durch das Dickenwachstum der Membran nicht beeinflußt.

b) Plasmodesmen. In sekundär verdickten Membranen zeigt die Tüpfelschließhaut im Macerationspräparat nicht mehr das feine Fibrillengeflecht wie in wachsenden Wänden, sondern große runde Poren von etwa 1000—1500 Å Durchmesser (SCOTT, HAMNER, BAKER und BOWLER 1956 für die Zwiebelwurzel, BÖHMER 1957 für die *Avena*koleoptile). SCOTT, HAMNER, BAKER und BOWLER schließen daraus, daß die Plasmodesmen in ausdifferenzierten Zellen gruppenweise zu dickeren Strängen verschmelzen („that plasmodesmata coalesce into a limited number of thickened strands, enclosed in the sharply defined pores of the hob-nail footprint pattern").

Die vorliegenden Untersuchungen bestätigen diese Vermutung jedoch nicht: Bei *Viscum* werden während der sekundären Verdickung der Membran die Plasmodesmenkanäle einfach verlängert, die Zellbrücken der ausdifferenzierten Gewebe unterscheiden sich von denen der wachsenden also nur durch die größere Länge der Plasmafäden. Sie sind in den Längswänden stark verzweigt mit 1000—5000 Å breiten Mittelknoten, von denen nach beiden Seiten durchschnittlich 3 oder 4 bis 500 Å dicke Fäden ausstrahlen (Abb. 4a, vgl. auch Abb. 4b *B*).

Wie das Kanalsystem solcher verzweigter Plasmodesmen im Fibrillenmuster der Tüpfelschließhaut aussieht, wäre noch am Macerationspräparat zu klären. Jedenfalls läßt es sich schlecht mit dem „hob-nail footprint pattern" von SCOTT, HAMNER, BAKER und BOWLER (1956) vereinigen.

D. Die Zahl der Plasmodesmen im Rindenparenchym von *Viscum album*

Die Zahl der Plasmodesmen pro Zelle wurde bei *Viscum* bereits von KUHLA (1900) lichtoptisch bestimmt. Im Rindenparenchym fand er im Mittel 500 Plasmaverbindungen für die ganze Zelle, etwa 80 auf einer Wand.

Er erhielt diese Werte, indem er die sog. „Endknötchen" der Plasmodesmen in der Tüpfelaufsicht zählte. Diese „Endknötchen" stellen aber Reste des bei der Präparation abgerissenen Protoplasten dar, die an den Plasmodesmen hängenbleiben und gewöhnlich mehrere miteinander verbinden. Die lichtmikroskopische Berechnung muß also zu geringe Werte ergeben. Da sie überdies die submikroskopische Aufspaltung der Plasmodesmen in viele feinste Fäden nicht erfaßt, kann sie nur ein annäherndes Bild des engen Zusammenhanges zwischen benachbarten Protoplasten vermitteln.

Bei den vorliegenden Untersuchungen wurden auf Flächenschnitten durch die Tüpfelschließhäute (vgl. Abb. 9, S. 618) im Rindenparenchym erwachsener *Viscum*sprößchen 15—60 Fadenanschnitte pro 1 μ^2 Tüpfelfläche gefunden. Da davon durchschnittlich je 3 in der Mittellamelle in einem Knoten vereinigt sind, entspricht dies 5—20 verzweigten

Plasmodesmen pro 1 μ^2 Tüpfelfläche. Diese Werte stimmen größenordnungsmäßig mit den Angaben von STRUGGER (1957a) — 6—7 Plasmodesmen pro 1 μ^2 — für *Allium cepa* überein.

Eine 1jährige Rindenzelle von *Viscum album* enthält danach in jeder ihrer etwa 2000 μ^2 großen Querwände, deren Fläche zu etwa 5% (100 μ^2) von Tüpfeln eingenommen wird, etwa 500—2000 Plasmodesmen. Auf jede der sechs 25 μ breiten und 40 μ hohen (etwa 1000 μ^2) Längswände entfallen in den etwa 800 μ^2 großen, zu etwa 20% (etwa 160 μ^2) getüpfelten Tüpfelstreifen etwa 800—3000 Plasmodesmen.

Eine Viscumrindenzelle von etwa 10000 μ^2 Oberfläche *steht also* bei etwa 1200 μ^2 Tüpfelfläche *mit insgesamt 6000—24000 Plasmodesmen mit den Nachbarzellen in Verbindung* — eine Tatsache, die bei allen physiologischen Erwägungen von fundamentaler Bedeutung sein muß und wegen der Schwierigkeit des Plasmodesmennachweises nur zu leicht vergessen wird.

Bei *Viscum* kommen demnach auf 100 μ^2 Wandfläche 50—200 Plasmodesmen, während KUHLA (1900) höchstens 6 pro 100 μ^2 fand. Die lichtmikroskopischen Schätzungen sind also um eine Zehnerpotenz zu niedrig.

Eine noch größere Zahl von Plasmodesmen bezogen auf die Wandfläche besitzen die jungen Rindenzellen vor dem Streckungswachstum, da sie, wie oben gezeigt wurde, prozentual stärker getüpfelt sind als die ausdifferenzierten. Natürlich ist die absolute Zahl der Plasmaverbindungen in der meristematischen Zelle genauso groß wie in der ausgewachsenen, nämlich etwa 6000—24000 pro Zelle; doch während diese Plasmodesmen bei der ausdifferenzierten Zelle sich auf etwa 10000 μ^2 Wandfläche verteilen, sind sie in der embryonalen Zelle auf etwa 5000 μ^2, also eine etwa nur halb so große Zelloberfläche zusammengedrängt.

Berücksichtigt man die vorstehend beschriebene Plasmodesmenverzweigung bei der Berechnung, so erhält man noch höhere Werte: *Von einer erwachsenen Rindenzelle von Viscum strahlen 20000—80000 einzelne Plasmafäden nach allen Seiten aus, die sich mit entsprechenden Fortsätzen der Nebenzellen gruppenweise in den Mittelknoten in der Wand vereinigen.*

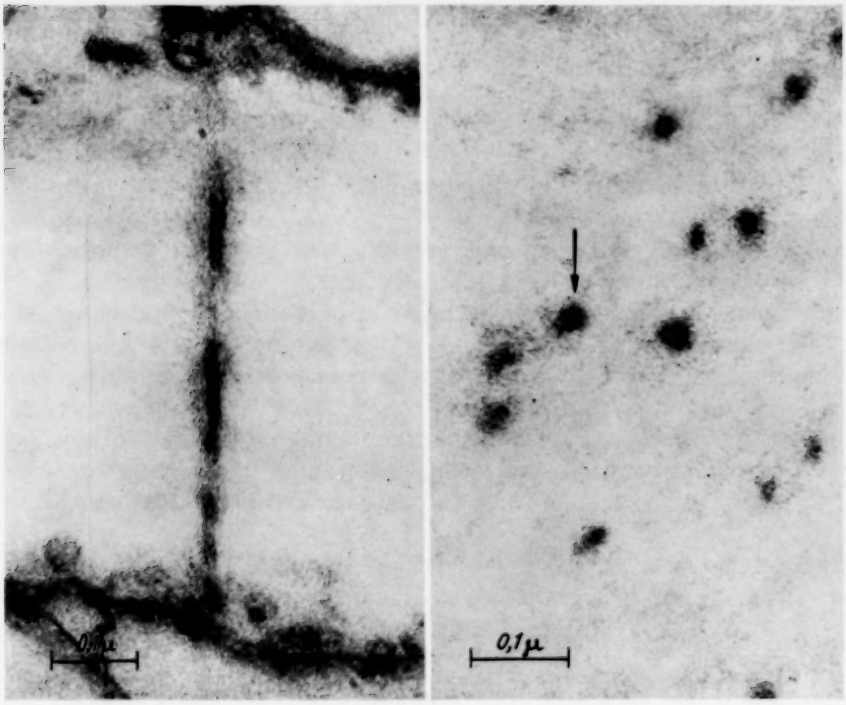
Die Verbindung zwischen benachbarten Protoplasten ist also noch weit inniger, als es das lichtmikroskopische Bild vermuten ließ, und obwohl die mitgeteilten Zahlen nur grobe Schätzungen sind, lassen sie doch die Bedeutung der Plasmodesmen für den Gewebeverband ahnen.

E. Die Plasmodesmenfeinstruktur

Die Plasmanatur der pflanzlichen Zellbrücken — lange Zeit Hauptproblem der Plasmodesmenforschung — ist heute durch elektronenmikroskopische Untersuchungen, die die Kontinuität mit dem Binnenplasma aufzeigten, wohl bewiesen. Dagegen steht jetzt die Frage im

Vordergrund, welche Plasmabestandteile die Plasmodesmen selbst aufbauen; darf man doch hoffen, aus ihrer Feinstruktur vielleicht auch endlich Aufschluß über ihre Funktion zu erhalten.

Der submikroskopische Feinbau der Plasmodesmen, der natürlich an die Grenze der zur Zeit möglichen Technik heranreicht, wird bisher unterschiedlich geschildert:



a b

Abb. 8a u. b. a *Viscum album*, Embryo, Plasmaverbindung längsgeschnitten. Elektronenoptisch (Akashi Tronscope TRS-50), Vergr. prim. 12000 ×, Endvergr. 120000 ×, b *Viscum album*, embryonale Blütenanlage, Plasmaverbindung quergeschnitten. Pfeil = ringförmiger Anschnitt eines Plasmafadens. Elektronenoptisch (Akashi Tronscope TRS-50), Vergr. prim. 15000 ×, Endvergr. 120000 ×

Sitte (1958) fand sie in der Erbsenkeimwurzel strukturlos wie die Matrix des Grundplasmas, Strugger (1957a) beschreibt beim Zwiebelwurzelmeristem in den Plasmodesmen schraubig gewundene Cytonemata, die denen des Grundplasmas entsprechen sollen, und Perner (1958) spricht beim Wurzelmeristem von *Cucurbita pepo* von „osmiophilen bzw. uranophilen Elementen nematischer Natur", die „eine Verbindung des Mesoplasmas gewährleisten".

Ein genaueres Bild des Plasmodesmenfeinbaues gibt allein Buvat (1957, 1958, 1960) für Wurzeln von *Allium cepa*, *Triticum vulgare* und den Vegetationspunkt von *Chrysanthemum segetum*: Der Plasmodesmenkanal der Wand soll von einem doppelt konturierten Plasmalemma aus-

gekleidet sein und in seinem Inneren Längsstrukturen („striations") enthalten. Da häufig Elemente des endoplasmatischen Reticulums auf die Plasmodesmenmündung zuführen, wird eine Fortsetzung der Reticulumzisternen durch die Plasmaverbindungen vermutet, eine Auffassung, der sich neuerdings SCHNEPF (1960 für *Drosophyllum*drüsenzellen) anschließt.

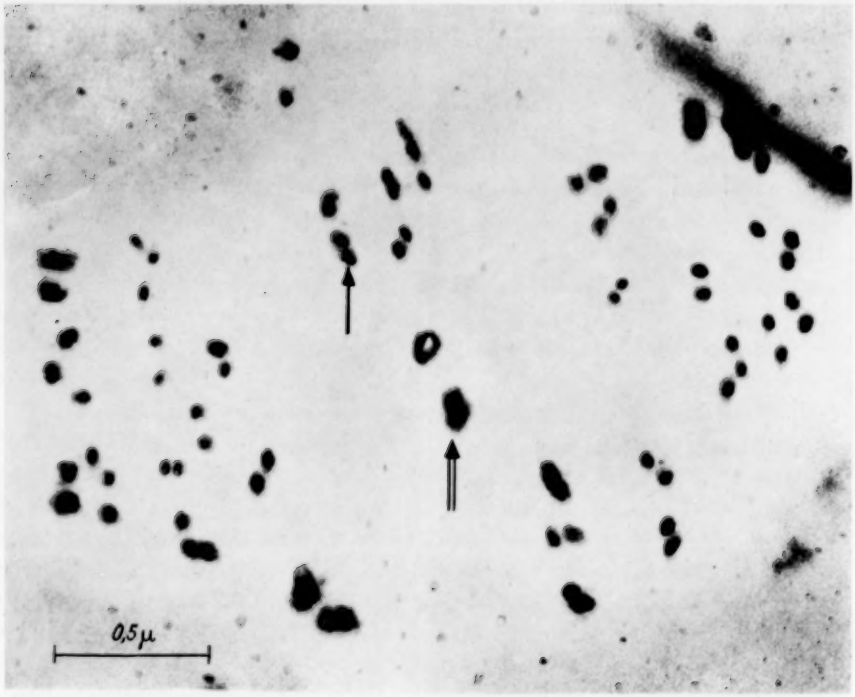


Abb. 9. *Viscum album*, Rinde eines 1jährigen Sprosses, Flächenschnitt durch eine Tüpfelschließhaut in einer Längswand. Die Plasmodesmen erscheinen dunkel in der schwach kontrastierten Membran. Pfeil = „Doppelröhren"-Struktur in einem Plasmafaden, quer. Doppelpfeil = „Röhren"-Struktur in einem Mittelknoten, schräg getroffen. Elektronenoptisch (Akashi Tronscope TRS-50), Vergr. prim. 12000 ×, Endvergr. 40000 ×

Bei den vorliegenden Untersuchungen erschienen die meristematischen Plasmodesmen von *Viscum* im Längsschnitt als Doppelstrukturen von 100—150 Å Durchmesser (Abb. 8a), im Querschnitt als „Ringe" entsprechender Dimensionen (Abb. 8b). Kombiniert man Längs- und Querschnitt, so ergibt sich für eine meristematische Plasmaverbindung also eine „Röhren"-Struktur. Die stark kontrastierte „Röhren"-Wandung ist dabei etwa 30 Å dick, das schwach kontrastierte Lumen etwa 50—80 Å weit.

Es liegt nahe, in der „Röhren"-Wandung die Plasmagrenzschicht zu vermuten, die den Plasmodesmenkanal in der Wand auskleidet und die nur schwach kontrastierte, elektronenoptisch strukturlose Plasma-

verbindung umschließt. Da es jedoch leider nicht gelang, außerhalb der Plasmodesmen an dem der Wand anliegenden Plasma eine Grenzschicht darzustellen, muß hier die Frage offenbleiben, ob die „Röhren"-Wandung tatsächlich in das Plasmalemma übergeht oder nicht.

Merkwürdigerweise gleichen die bis 500 Å dicken Plasmodesmen ausdifferenzierter Gewebe nicht einfach entsprechend weiteren „Röhren", sondern scheinen vielmehr von mehreren engen „Röhren" von etwa 100 bis 150 Å Durchmesser aufgebaut zu werden. So zeigt Abb. 9 (Pfeil) z. B. eine „Doppelröhren"-Struktur bei einem Plasmafaden. Auch die Mittelknoten enthalten in unübersichtlicher Anordnung Doppelstrukturen entsprechender Dimensionen (Abb. 9, Doppelpfeil).

Es scheint also, daß es sich bei den Plasmodesmen nicht einfach um „Röhren" handelt, wobei eine elektronenoptisch dichtere Membran der „Röhren"-Wandung entsprechen würde, sondern daß die feinen Plasmaverbindungen noch eine kompliziertere Innenstruktur besitzen.

Möglicherweise handelt es sich bei diesen Binnenstrukturen nochmals um Kanäle, vergleichbar etwa den Zisternen des endoplasmatischen Reticulums, wie sie von Buvat (1957, 1958, 1960) und Schnepf (1960) in den Plasmodesmen beschrieben worden sind. Tatsächlich erscheinen die Plasmodesmen-„Röhren" beim Übergang in die Zelle bisweilen an Doppelstrukturen angeschlossen, die zum endoplasmatischen Reticulum gehören könnten. Für eine eindeutige Aussage reichen die vorliegenden Aufnahmen jedoch nicht aus.

F. Die Plasmodesmen ruhender Gewebe

Wie die elektronenmikroskopischen Untersuchungen bei *Viscum album* zeigten, sind die Plasmodesmen der erwachsenen Gewebe komplizierter gebaut, als es das lichtmikroskopische Bild bisher vermuten ließ: Es sind vielfach nicht einfache Fäden, sondern ganze Fadenbüschel, die sich in der Mitte der Wand zu größeren Plasmamassen vereinigen.

Eine derartige Struktur macht es recht unwahrscheinlich, daß die Plasmaverbindungen zwischen benachbarten Protoplasten ohne Schaden eingezogen und wieder in die Wand gestreckt werden können. Es war daher erwünscht, diejenigen Angaben nachzuprüfen, nach denen ein reversibles Einschmelzen von Plasmodesmen zu gewissen Zeiten möglich sein soll.

Nach Henckel und Oknina (1948), Oknina (1948), Henckel (1950) und Kolomiec (1955) weicht der Protoplast in manchen Organen beim Übergang in den Ruhezustand von der Zellwand zurück. Dabei sollen die Plasmodesmen aus der Membran gezogen und eingeschmolzen werden. Umgekehrt soll bei Beendigung der Ruhe der Protoplast sich wieder der Membran anlegen und pseudopodiengleich neue Fortsätze in die

leeren Wandkanäle treiben. Im Ruhezustand gliche so ein vielzelliger Organismus einer Zellkolonie, ja der Ruhezustand würde geradezu durch diese zeitweilige Unterbrechung der plasmatischen Verbindungen zwischen den Zellen eine Erklärung finden.

Eine Behauptung von solcher Tragweite schien einer gründlichen Nachprüfung wert.

In den vorliegenden Untersuchungen wurden sowohl die von OKNINA (1948) und KOLOMIEC (1955) bearbeiteten Objekte nachuntersucht, als auch eine große Reihe weiterer herangezogen, die in der Tabelle 1 zusammengefaßt sind. Die Versuchspflanzen OKNINAs (1948) sind dabei mit *, die Objekte KOLOMIECs (1955) mit ** bezeichnet.

Es muß hier ausdrücklich darauf hingewiesen werden, daß die Befunde von OKNINA (1948) am Rindenparenchym („korovaja parenchima" S. 706, 708) verschiedener Bäume gewonnen worden sind, nicht etwa am Cambium, wie MEEUSE (1957) im neuesten Sammelreferat über Plasmodesmen nach SAMISH (1954) falsch zitiert.

Tabelle 1

1. Coniferennadeln (Mesophyll)
   - *Pinus* silvestris*
   - *Pinus nigra*
   - *Picea* excelsa*
   - *Abies concolor*
   - *Tsuga diversifolia*
   - *Pseudotsuga taxifolia*
   - *Cedrus atlantica*
   - *Cunninghamia lanceolata*
   - *Juniperus communis*
   - *Chamaecyparis pisifera*
   - *Taxus* baccata*
   - *Cephalotaxus dupracea*
   - *Torreya california*

2. Rinden (Parenchym)
   - *Crataegus monogyna*
   - *Malus* silvestris*
   - *Malus tschonoskii*
   - *Pyrus* communis*
   - *Sorbus* aucuparia*
   - *Parotia persica*
   - *Aesculus hippocastanum*
   - *Rhamnus frangula*
   - *Corylus avellana*
   - *Alnus glutinosa*
   - *Carpinus betulus*
   - *Fagus silvatica*
   - *Juglans* regia*
   - *Salix alba*
   - *Morus* alba*
   - *Syringa reflexa*
   - *Sambucus nigra*
   - *Vitis* vinifera*

3. Samen (Keimblätter bzw. Endosperm)
   - *Aesculus hippocastanum*
   - *Helianthus* annuus*
   - *Pisum sativum* „Kleine Rheinländerin"
   - *Phaseolus* vulgaris* „Saxa fadenlos"
   - *Vicia faba* „2 × weiße"
   - *Lupinus polyphyllus*
   - *Triticum* sativum* „Hochzucht Carsten Dickkopfweizen V"

4. Rhizome (Parenchym)
   - *Iris germanica* „Gerda"
   - *Convallaria majalis*
   - *Anemone nemoralis*

5. Knollen (Speicherparenchym)
   - *Solanum* tuberosum* „Bona"

6. Zwiebeln (Schuppenepidermis)
   - *Allium* cepa* „Zittauer"

7. Wurzeln (Rindenparenchym)
   - *Trifolium** hybridum*
   - *Iris germanica* „Gerda"

Nadeln, Rinden, Rhizome und Wurzeln wurden von Herbst 1956 bis Winter 1957/58 in regelmäßigen Abständen von 8—14 Tagen an Freilandmaterial aus dem

Bonner Botanischen Garten bearbeitet. Im Winter 1958/59 wurden die Vorjahresergebnisse an Stichproben überprüft. Eine Übersicht über die Temperaturen im Raum Bonn während der Versuchsmonate gibt Tabelle 2 [1].

Tabelle 2

Jahr	Monat	Lufttemperatur (°C) im Raum Bonn				
		Tagesmittel	Mittl. max.	Mittl. min.	Abs. max.	Abs. min.
1956	IX	15,4	20,3	10,7	25,4	5,5
	X	10,0	13,7	7,0	23,2	0,4
	XI	4,8	7,5	2,1	13,0	−7,1
	XII	5,2	6,8	3,3	14,7	−6,2
1957	I	3,0	5,8	6,0	14,2	−7,2
	II	6,5	9,3	4,0	14,6	−2,9
	III	9,6	14,0	5,9	20,0	−1,1
	IV	9,5	14,8	4,0	22,0	−1,8
	V	11,4	16,2	6,1	24,3	6,3
	VI	18,1	23,8	11,2	33,4	6,7
	VII	19,2	23,8	15,0	37,0	10,2
	VIII	16,5	20,7	12,5	27,5	5,6
	IX	13,2	17,5	9,4	27,2	0,4
	X	10,4	15,1	6,1	20,5	−0,8
	XI	6,2	8,5	3,5	15,3	−4,9
	XII	2,3	4,8	−1,0	12,6	−8,9
1958	X	—	14,3	8,0	20,1	2,2
	XI	—	7,8	4,1	12,4	0,6
	XII	—	7,2	2,3	11,6	−4,0
1959	I	—	4,9	−0,1	13,3	−5,5
	II	—	7,1	−1,8	17,3	−6,3
	III	—	12,8	4,1	19,6	−3,0

Zwiebeln und Kartoffeln wurden von September 1956 bis März 1957 im Bonner Botanischen Institut bei +2° C im Eisschrank gelagert (Oknina 1948) und bei Zimmertemperatur durch Austreibenlassen aus der Ruhe geweckt.

Samen wurden lufttrocken und nach Quellen bzw. Auskeimen untersucht.

Die Färbung der Plasmodesmen erfolgte dabei mit dem von Henckel und Oknina (1948), Oknina (1948) und Kolomiec (1955) verwendeten Meyerschen (1897) Pyoktanin in der Variation von Johansen (1940). Die Mikrophotographien wurden mit einer Zeiss-Wasserimmersion 70×, A = 1,25, einem Photookular 12× und der Exakta Varex aufgenommen.

Trotz sorgfältiger Bemühungen konnte jedoch in zahlreichen Versuchen kein Unterschied zwischen den Plasmodesmen ruhender und aktiver Gewebe festgestellt werden: Wohlausgebildete Plasmaverbindungen fanden sich Sommer wie Winter in Rinden, Nadeln, Rhizomen und Wurzeln, bei trockenen wie gequollenen Samen, bei ruhenden wie treibenden Zwiebeln und Knollen.

[1] Die meteorologischen Daten stellte freundlicherweise Herr Dr. J. Seemann, Leiter der Agrarmeteorologischen Versuchsstelle Bonn, zur Verfügung. Ihm sei hierfür herzlich gedankt.

Eine Ausnahme bildeten nur die Keimblätter der Sonnenblume, in deren außerordentlich dünnen Wänden Plasmodesmen weder im entquollenen noch im keimenden Samen mit Sicherheit nachgewiesen werden konnten.

So zeigt Abb. 10 Wände aus der Aleuronschicht des Weizens (einem Versuchsobjekt OKNINAs 1948) im lufttrockenen (Abb. 10a) und im keimenden (Abb. 10b) Korn. Wie man sieht, sind die Plasmodesmen

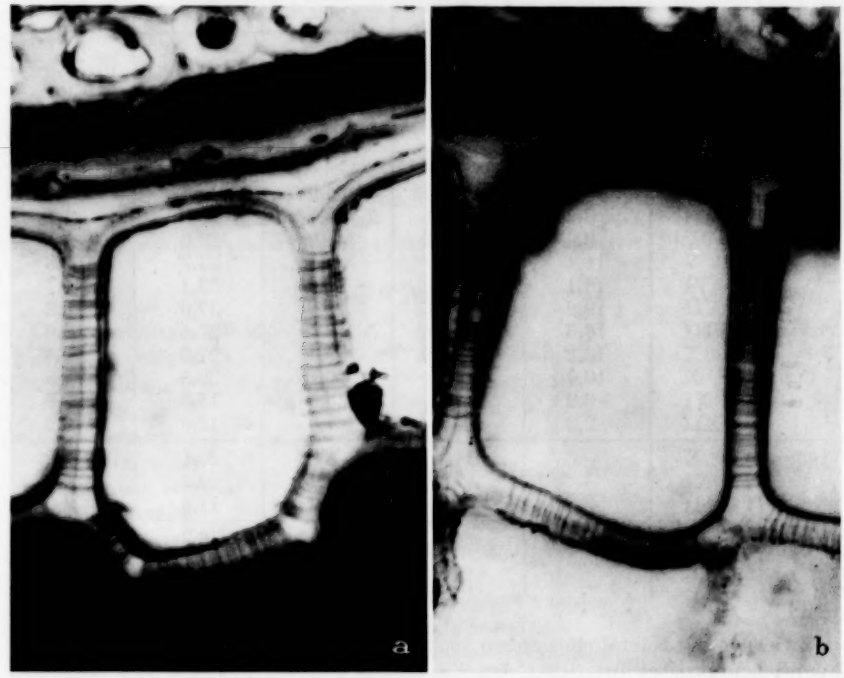


Abb. 10a u. b. *Triticum sativum*. a Querschnitt durch die Aleuronschicht der lufttrockenen Frucht, b Querschnitt durch die Aleuronschicht der keimenden Frucht. Lichtoptisch etwa 1000 ×.

unabhängig vom physiologischen Zustand der Zellen stets gleich zahlreich und gut entwickelt.

Der Widerspruch zwischen den Angaben von HENCKEL und OKNINA (1948), OKNINA (1948) und KOLOMIEC (1955) und den vorliegenden Befunden könnte vielleicht noch folgendermaßen erklärt werden:

In der Zeitspanne zwischen Probenentnahme und Fixierung — z. B. beim Schneiden oder bei Freilandpflanzen während des Transports — könnten unkontrollierbare Reize und Veränderungen im Gewebe abgelaufen sein, die in der ruhenden Pflanze ein rasches Wiederausstrecken der eingezogenen Plasmodesmen bewirkten.

Um diese — allerdings auch in den Versuchen der genannten Autoren in gleicher Weise vorhandene — Fehlerquelle auszuschalten, wurden alle Gewebe unmittelbar nach der Entnahme total (enthäutete Samen) oder grob zerteilt (Nadeln, Rinden, Wurzeln, Rhizome, Knollen und Zwiebeln) in einer Gilsonlösung (LAMBERTZ 1954)

sofort fixiert und erst anschließend auf dem Gefriermikrotom geschnitten und gefärbt.

Obwohl die Zellen so innerhalb von Sekunden abgetötet werden konnten, wurden auch in ruhenden Pflanzen Plasmodesmen nach wie vor in normaler Zahl gefunden. Dabei war kein Unterschied zwischen den Plasmaverbindungen der Zellen aus dem Blockinneren und dem Wundrand zu erkennen. Eine Verfälschung der Versuchsergebnisse durch die Präparation kann also ausgeschlossen werden.

Dagegen ließe sich weiter einwenden, daß die untersuchten Pflanzenrassen nicht mit den von HENCKEL und OKNINA (1948), OKNINA (1948) und KOLOMIEC (1955) verwendeten identisch waren. Tatsächlich konnten in den meisten Fällen nicht dieselben Sorten bearbeitet werden, weil einerseits die Sortenbezeichnungen bei OKNINA (1948) vielfach fehlen, andererseits die genannten Varietäten (z. B. beim Rotklee, KOLOMIEC 1955) nicht zu beschaffen waren. Da die einzelnen Rassen sich bei der Winterruhe verschieden verhalten sollen, kann dieser Vorwurf also nicht unbedingt zurückgewiesen werden. Doch waren auch bei gleichen Sorten die Befunde OKNINAS (1948) nicht reproduzierbar: Obwohl bei der Zwiebel die empfohlene „Zittauer" verwendet wurde, konnte in keinem Fall ein Einziehen und Wiederausstrecken von Plasmodesmen beobachtet werden.

So blieb nur noch die Erklärung übrig, daß unter den Bedingungen der vorliegenden Versuche die Pflanzen aus irgendeinem Grunde — sei es das mit dem russischen Winter verglichen milde westeuropäische Klima, sei es falsche Lagerung oder ähnliches — sich gar nicht im Zustand der Ruhe befanden. Obschon sorgfältig darauf geachtet worden war, die angegebenen Bedingungen möglichst genau nachzuahmen, wäre ein solcher Einwand schwer zu entkräften, wenn nicht HENCKEL und OKNINA (1948) selbst eine Methode ausgearbeitet hätten, die es erlauben soll, festzustellen, ob sich eine Pflanze wirklich im Ruhezustand befindet oder nicht. So soll in 1 mol Saccharoselösung der von der Wand abgehobene, ruhende Protoplast eine Konvexplasmolyse, der der Wand verhaftete, aktive Protoplast dagegen eine Konkavplasmolyse zeigen.

Um zu prüfen, ob die Versuchspflanzen sich nach diesen Kriterien im Zustand der Ruhe befanden, wurden daher zunächst obere Schuppenepidermen kühl gelagerter Zwiebeln mit 1 mol Saccharoselösung behandelt. Es trat Konvexplasmolyse ein, man konnte also annehmen, daß die Ruhe bereits begonnen hatte. Anschließend wurden die plasmolysierten Gewebe wie üblich fixiert und gefärbt. Dabei zeigte es sich, daß alle Wände der ruhenden Zellen reichlich von Plasmodesmen durchzogen waren, die bekanntlich (STRASBURGER 1901) meist in der Wand steckenbleiben und abreißen.

Man muß also daraus folgern, daß ein reversibles Einschmelzen von Protoplasmaverbindungen zwar vielleicht möglich (HENCKEL und OKNINA 1948, OKNINA 1948, KOLOMIEC 1955), sicher aber nicht notwendig mit dem Übergang in den Ruhezustand verbunden ist, wie dies von den Autoren behauptet wird.

Die Befunde von HENCKEL und OKNINA (1948), OKNINA (1948) und KOLOMIEC (1955) verblüffen dabei um so mehr, als ihre Versuchspflanzen zum größten Teil bereits von anderer Seite eingehend studiert (Getreideendosperme: TANGL 1885, MÜHLDORF 1937, WULF 1905, 1906a und b, GÜNTHER 1927; *Pinus*: HILL 1901), ja sogar als besonders zuverlässige Kursobjekte empfohlen worden sind (Rinden dikotyler Pflanzen: STRASBURGER 1897, Kartoffelknolle: JOHANSEN 1940). Es ist schwer

denkbar, daß ein Einschmelzen von Plasmodesmen beim Übergang in den Ruhezustand von den früheren Bearbeitern so lange übersehen worden sein sollte, werden doch in einigen Arbeiten Plasmodesmen gerade in ruhenden Geweben ausdrücklich beschrieben [z. B. GÜNTHER 1927, S. 310: „Am besten waren die Plasmodesmen an Schnitten aus ruhenden (Weizen!) Samen zu beobachten"].

G. Diskussion

In den vorliegenden Untersuchungen wurde besonders die Entwicklung der Plasmodesmen in der Rinde von *Viscum album* elektronenmikroskopisch vom Meristem bis zum fertigen Gewebe verfolgt. Dabei zeigte es sich, daß die bisherigen Vorstellungen von der Entstehung und dem Bau der Plasmaverbindungen in verschiedenen Punkten korrigiert werden müssen.

In Übereinstimmung mit zahlreichen anderen Angaben (z. B. STRUGGER 1957a, HODGE, MARTIN und MORTON 1957, BUVAT 1957, 1958, HEITZ 1957a und b, SITTE 1958, PERNER 1958, SETTERFIELD, STERN und JOHNSTON 1959), fanden sich auch bei *Viscum* Plasmodesmen schon in den jüngsten meristematischen Wänden.

Es sind hier feine Fäden von nur 150 Å Breite. Es verwundert daher nicht, daß bei macerierten jungen Wänden in der weitmaschigen Streuungstextur der Cellulosefibrillen nach dem Herauslösen der übrigen Wandsubstanzen die Durchtrittsstellen der meristematischen Plasmodesmen bisher nicht entdeckt werden konnten (FREY-WYSSLING 1959). Das Fehlen von Plasmodesmenporen im jungen Fibrillengeflecht sollte also nicht als Beweis für ein Fehlen von Plasmaverbindungen in embryonalen Wänden überhaupt gewertet werden (FREY-WYSSLING 1959).

Da Zellbrücken im Dünnschnitt nach BUVAT und PUISSANT (1958) im Wurzelmeristem von *Allium cepa* bereits zwischen den Phragmoplastenvacuolen sichtbar sind und in keinem Fall ein nachträgliches Einwachsen von Plasmafäden in die Membran beobachtet wurde, ist es wahrscheinlich, daß sie bereits während der Zellteilung entstehen.

Schon TANGL (1879), RUSSOW (1883) und GARDINER (1900) vermuteten eine frühzeitige Anlage der Plasmodesmen bei der Zellteilung; die meisten Untersucher sprachen sich jedoch dagegen aus (Literaturübersicht bei MEEUSE 1957). Neben der Unmöglichkeit, Plasmodesmen lichtmikroskopisch in jungen Wänden nachzuweisen, war der Haupteinwand der, daß manche Wände nicht neugebildet werden, sondern generationenlang durch Streckung aus vorhandenen hervorgehen. Da diese Wände trotzdem zahlreiche Plasmodesmen besitzen, müssen sie hier unabhängig von der Zellteilung entstanden sein (STRASBURGER 1901). Zwei verschiedene Bildungsweisen hielt man aber bisher für unwahrscheinlich.

Wie die vorliegenden Untersuchungen zeigen, gibt es jedoch bei *Viscum* tatsächlich 2 Wege, auf denen Plasmodesmen entstehen:

1. primär bei der Neuanlage der Wand, vermutlich während der Zellteilung und

2. sekundär in wachsenden Wänden durch Teilung der primär gebildeten Plasmafäden.

Eine Plasmodesmenteilung wurde zwar schon von Russow (1883) diskutiert, von Strasburger (1901) aber als „ungeheuerliche Vorstellung" verworfen. Er nahm an, daß pseudopodienartig korrespondierende Plasmafortsätze sekundär in die Wand eindringen und zu Plasmodesmen werden.

In allen Fällen, wo Zellen nachträglich in Kontakt treten, wie bei Thyllentüpfeln, Milchröhren (Strasburger 1901), Pfropfbastarden (Buder 1911) und „gleitendem Wachstum" (Krabbe 1886, Jost 1901, vgl. auch Frey-Wyssling 1959), nicht zuletzt auch bei Plasmaverbindungen zwischen Parasit und Wirt (Schumacher und Halbsguth 1939), ist die Entstehung der Plasmodesmen tatsächlich nur auf diesem Wege denkbar.

Beim symplastischen Wachstum von Zellen, die bereits durch Plasmodesmen verbunden sind, werden dagegen — wenigstens bei *Viscum* — keine neuen Zellbrücken geschlagen, sondern die alten wirklich geteilt. Der Teilungsvorgang ist dabei komplizierter, als zu erwarten war: Statt daß die Plasmafäden verdickt und in 2 Hälften gespalten werden, scheint die Durchtrennung zunächst nur an den Fadenenden zu erfolgen, unterbleibt jedoch in der Mitte. Es entstehen so verzweigte Plasmodesmen, bei denen von einem Plasmaknoten in der Mitte der Wand nach beiden Seiten mehrere Fäden ausstrahlen (vgl. Abb. 4a, S. 608). Erst stark verzweigte Plasmodesmen zerfallen in schwächer verzweigte Bruchstücke, die wieder auswachsen, geteilt werden usf.

Möglicherweise ist dieser Teilungsmodus durch ein Multinetzwachstum der Wand zu erklären, indem bei der Dehnung der innersten Wandschichten die Plasmodesmenkanäle erweitert, bei der darauffolgenden Ablagerung engmaschiger neuer Häute aber aufgeteilt werden.

Die alte Regel „es gibt keine verzweigten Plasmodesmen" („branched plasmodesmata do not occur", Meeuse 1957!) gilt also — zumindest bei *Viscum* — nicht im sublichtmikroskopischen Bereich. Überall, wo Plasmodesmen in wachsenden Wänden sekundär vermehrt werden müssen, ist daher mit dem Auftreten verzweigter Plasmodesmenteilungsstadien nach dem hier aufgezeigten Beispiel von *Viscum* zu rechnen.

Damit findet gleichzeitig eine lichtmikroskopisch schon lange bekannte, bisher aber nicht deutbare Struktur in den Plasmodesmen, der sog. Mittelknoten, seine Erklärung. Knotenartige Fadenanschwellungen in der Wandmitte wurden ja bereits vor langer Zeit regelmäßig beobachtet

und meist als Quellungsartefakte gedeutet (KOHL 1900, STRASBURGER 1901, MEYER 1920, MÜHLDORF 1937, MEEUSE 1957). Sie sind jedoch zweifellos mit den Mittelknoten der Plasmodesmenteilungsstadien identisch, also kein Kunstprodukt, sondern wesentlicher plasmatischer Bestandteil der verzweigten Plasmodesmen, indem sie als „zentrale Schaltstation" die von beiden Seiten kommenden Plasmafortsätze aneinander anschließen.

In den Zellbrücken wurde oft eine „Röhren"-artige Substruktur (Abb. 8, S. 617) beobachtet, die vielleicht mit dem endoplasmatischen Reticulum in Verbindung steht (vgl. BUVAT 1957, 1958, 1960 und SCHNEPF 1960). Sollten sich diese ersten Beobachtungen weiter bestätigen, so ist die alte Auffassung der Plasmodesmen als Bestandteile der „Hautschicht", die „ihrer chemischen Zusammensetzung nach vom Cytoplasma verschieden" sind und „keine Plasmaverschmelzung benachbarter Zellen herbeiführen" (MÜHLDORF 1937) nicht mehr aufrechtzuerhalten. Die Anwesenheit von Reticulumelementen zwingt vielmehr, sie als „offene Kommunikationen" von Elementen des Binnenplasmas im Sinne von TANGL (1879) zu betrachten.

Zusammenfassung

Die Entwicklung der Plasmodesmen im Rindenparenchym von *Viscum album* wurde elektronenmikroskopisch untersucht.

Im Meristem entstehen die Plasmodesmen während des Teilungswachstums auf 2 verschiedenen Wegen:

In den neu eingezogenen Quermembranen werden feine fadenförmige Plasmodesmen primär angelegt, vermutlich im Verlauf der Zellteilung.

In den Längsmembranen, die nicht neugebildet werden, sondern durch Streckung aus vorhandenen hervorgehen, werden die Plasmodesmen sekundär durch Teilung vermehrt. Dabei entstehen bisher noch nie beobachtete verzweigte Plasmodesmen, bei denen von einer zentralen Plasmamasse in der Mitte der Wand, dem Mittelknoten der Lichtmikroskopie, nach beiden Seiten mehrere Fäden ausstrahlen (Abb. 4, S. 608).

Das Auftreten solcher verzweigter Plasmodesmen kann durch Multinetzwachstum der Wand erklärt werden.

Während des Streckungswachstums nimmt die Zahl der Plasmodesmen nicht weiter zu.

Die fertige Zelle besitzt bei etwa 10000 μ^2 Oberfläche etwa 6000 bis 24000 Plasmodesmen, was die lichtoptischen Schätzungen KUHLAs (1900) um eine Zehnerpotenz übertrifft.

Plasmodesmen aller Altersstadien zeigen häufig eine submikroskopische „Röhren"-Struktur.

Angaben russischer Autoren über eine zeitweilige Unterbrechung der Plasmaverbindungen bei ruhenden Organen wurden nachgeprüft, konnten aber nicht bestätigt werden.

Literatur

Baranetzki, M. J.: Epaississement des parois des éléments parenchymateux. Ann. des Sci. natur. Bot., VII. s. **4**, 135—301 (1886).

Böhmer, H.: Untersuchungen über das Wachstum und den Feinbau der Zellwände in der *Avena*koleoptile. Planta (Berl.) **50**, 461—497 (1957).

Buder, J.: Studien an *Laburnum Adami*. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **5**, 209—284 (1911).

Buvat, R.: L'infrastructure des plasmodesmes et la continuité des cytoplasmes. C. R. Acad. Sci. (Paris) **245**, 198—201 (1957).

— Recherches sur les infrastructures du cytoplasme, dans les cellules du méristème apical, des ébauches foliaires et des feuilles développées d'*Elodea canadensis*. Ann. des Sci. natur. Bot., XI. s. 121—161 (1958).

— L'infrastructure des plasmodesmes dans les cellules parenchymateuses des cordons conducteurs jeunes de *Cucurbita pepo* L. C. R. Acad. Sci. (Paris) **250**, 170—172 (1960).

—, et A. Puissant: Observations sur la cytodiérèse et l'origine des plasmodesmes. C. R. Acad. Sci. (Paris) **247**, 233—235 (1958).

Frey-Wyssling, A.: Die pflanzliche Zellwand. Berlin-Göttingen-Heidelberg 1959.

—, and H. R. Müller: Submicroscopic differentiation of plasmodesmata and sieve plates in *Cucurbita*. J. ultrastruct. Res. **1**, 38—48 (1957).

—, u. H. Stecher: Über das Flächenwachstum der pflanzlichen Zellwände. Experientia (Basel) **7**, 420—421 (1951).

Gardiner, W.: The genesis and development of the walls and connecting threads of the plant. Proc. roy. Soc. B **66**, 186—188 (1900).

Günther, O.: Beiträge zur Kenntnis der Entwicklung des Getreideendosperms und seines Verhaltens bei der Keimung. Bot. Archiv **18**, 299—319 (1927).

Heitz, E.: Die strukturellen Beziehungen zwischen pflanzlichen und tierischen Chondriosomen. Z. Naturforsch. **12**b, 576—578 (1957a).

— Über Plasmastrukturen bei *Antirrhinum majus* und *Zea Mays*. Z. Naturforsch. **12**b, 579—583 (1957b).

Henckel, P. A.: The adaptive significance of dormancy in plants. Proc. 7th Int. Bot. Congr. Stockholm 1950.

—, u. E. Z. Oknina: Über den Ruhezustand bei den Pflanzen. [Russisch.] Dokl. Akad. Nauk SSSR **62**, 409—412 (1948).

Hill, A. W.: The distribution and character of connecting threads in the tissues of *Pinus silvestris* and other allied species. Phil. Trans. B **194**, 83—125 (1901).

Hodge, A. J., E. M. Martin and R. K. Morton: The structure of some cytoplasmic components of plant cells in relation to the biochemical properties of isolated particles. J. biophys. biochem. Cytol. **3** (1), 61—70 (1957).

Huber, B., u. R. W. Kolbe: Elektronenmikroskopische Untersuchungen an Siebröhren. Svensk. bot. T. **42**, 364—371 (1948).

Johansen, D. A.: Plant microtechnique. New York 1940.

Jost, L.: Über einige Eigentümlichkeiten des Kambiums der Bäume. Bot. Z. **59**, 1—24 (1901).

Jungers, V.: Recherches sur les plasmodesmes chez les végétaux. Cellule **40**, 7—82 (1930).

KOHL, F. G.: Dimorphismus der Plasmaverbindungen. Ber. dtsch. Bot. Ges. **18**, 364—372 (1900).

KOLOMIEC, P.T.: Konvexplasmolyse als Zeichen für den Ruhe- und Wachstumszustand des roten Klees. [Russisch.] Moskauer MW Lomonosow-Staats-Universität. Fiziol. Rastenij **2**, 141—147 (1955).

KRABBE, G.: Das gleitende Wachstum bei der Gewebebildung der Gefäßpflanzen. Berlin 1886.

KUHLA, F.: Die Plasmaverbindungen bei *Viscum album*. Bot. Z. **58**, 29—58 (1900).

LAMBERTZ, P.: Untersuchungen über das Vorkommen von Plasmodesmen in den Epidermisaußenwänden. Planta (Berl.) **44**, 147—190 (1954).

LIVINGSTONE, L. G.: The nature and distribution of plasmodesmata in the tobacco plant. Amer. J. Bot. **32**, 75—87 (1933).

MEEUSE, A. D. J.: Plasmodesmata (Vegetable Kingdom). Protoplasmatologia, Handbuch der Protoplasmaforschung, Bd. 2A/1c, S. 1—43. Wien 1957.

MERICLE, L.W., and W. G. WHALEY: Cell wall structure in apical meristems. Bot. Gaz. (Chicago) **114**, 382—391 (1953).

MEYER, A.: Über die Methoden zum Nachweis der Plasmaverbindungen. Ber. dtsch. bot. Ges. **15**, 166—177 (1897).

— Morphologische und physiologische Analyse der Zelle. Jena 1920.

MÜHLDORF, A.: Das plasmatische Wesen der pflanzlichen Zellbrücken. Beih. bot. Zbl. A **56**, 171—364 (1937).

OKNINA, E. Z.: Über die Plasmodesmen der sich im Ruhezustand befindlichen Pflanzenzellen. [Russisch.] Dokl. Akad. Nauk SSSR. **62**, H. 5, 705—708 (1948).

PERNER, E. S.: Elektronenmikroskopische Untersuchungen zur Cytomorphologie des sogen. Golgisystems in Wurzelzellen verschiedener Angiospermen. Protoplasma **49**, 407—443 (1958).

PRIESTLEY, J. H.: The physiology of cambial activity. 2. The concept of "sliding growth". New Phytologist **29**, 96—140 (1931).

ROELOFSEN, P. A.: The plant cell wall. In Handbuch der Pflanzenanatomie, Bd. 3, 4. Abt. Cytologie. Berlin 1959.

—, and A. L. HOUWINK: Cell wall structure of staminal hairs of *Tradescantia virginica* and its relation with growth. Protoplasma **40**, 1—22 (1951).

RUSSOW, E.: Über die Perforation der Zellwand und den Zusammenhang der Plasmakörper benachbarter Zellen. S.-B. naturforsch. Ges. Univ. Dorpat **6**, 562—585 (1883).

SAMISH, R. M.: Dormancy in woody plants. Ann. Rev. Plant Physiol. **5**, 183—204 (1954).

SCHLEIDEN, M. J.: Einige Bemerkungen über den vegetabilischen Faserstoff und sein Verhältnis zum Stärkemehl. Pogg. Ann. **43**, 391—398 (1838).

SCHNEPF, E.: Zur Feinstruktur der Drüsen von *Drosophyllum lusitanicum*. Planta (Berl.) **54**, 641—674 (1960).

SCHÜEPP, O.: Meristeme. In LINSBAUERS Handbuch der Pflanzenanatomie, Bd. 4: Meristeme. 1. Abt., 2. Teil: Histologie. Berlin 1926.

SCHUMACHER, W., u. W. HALBSGUTH: Über den Anschluß einiger höherer Parasiten an die Siebröhren der Wirtspflanzen. Jb. wiss. Bot. **87**, 324—355 (1939).

SCOTT, F. M., K. C. HAMNER, E. BAKER and E. BOWLER: Electron microscope studies of cell wall growth in the onion root. Amer. J. Bot. **43**, 313—324 (1956).

—, and M. LEWIS: Pits, intercellular spaces, and internal "suberization" in the apical meristems of *Ricinus communis* and other plants. Bot. Gaz. (Chicago) **114**, 253—264 (1953).

Setterfield, G., H. Stern and F. B. Johnston: Fine structure in cells of pea and wheat embryos. Canad. J. Bot. **37**, 65—72 (1959).

Sitte, P.: Die Ultrastruktur von Wurzelmeristemzellen der Erbse. Protoplasma **49**, 447—522 (1958).

Stecher, H.: Über das Flächenwachstum der pflanzlichen Zellwände. Mikroskopie **7**, 8—30 (1952).

Strasburger, E.: Das botanische Praktikum. Jena 1897.

— Über Plasmaverbindungen pflanzlicher Zellen. Jb. wiss. Bot. **36**, 493—601 (1901).

Strugger, S.: Der elektronenmikroskopische Nachweis von Plasmodesmen mit Hilfe der Uranylimprägnierung an Wurzelmeristemen. Protoplasma **48**, 231—236 (1957a).

— Elektronenmikroskopische Beobachtungen an den Plasmodesmen des Urmeristems der Wurzelspitze von *Allium cepa*. Ein Beitrag zur Kritik der Fixation und zur Beurteilung elektronenmikroskopischer Größenangaben. Protoplasma **48**, 365—367 (1957b).

Tangl, E.: Über offene Communicationen zwischen den Zellen des Endosperms einiger Samen. Jb. wiss. Bot. **12**, 170—190 (1879).

— Studien über das Endosperm einiger Gramineen. S.-B. Akad. Wiss. Wien **92**, Abt. **1**, 72—100 (1885).

Tupper-Carey, R. M., and J. H. Priestley: The cell wall in the radicle of *Vicia faba*, and the shape of the meristematic cells. New Phytologist **23**, 156—159 (1924).

Volz, G.: Elektronenmikroskopische Untersuchungen über die Porengröße pflanzlicher Zellwände. Mikroskopie **7**, 251—266 (1952).

Wardrop, A. B.: The mechanism of surface growth involved in the differentiation of fibres and tracheids. Austral. J. Bot. **2**, 165—175 (1954).

— The mechanism of surface growth in the parenchyma of *Avena* coleoptiles. Austral. J. Bot. **3**, 137—147 (1955).

Whaley, W. G., L. W. Mericle and C. Heimsch: The wall of the meristematic cell. Amer. J. Bot. **39**, 20—26 (1952).

Wilson, K.: Extension growth in primary cell walls with special reference to *Elodea canadensis*. Ann. Botany **21**, 1—11 (1957).

— Extension growth in primary cell walls with special reference to *Hippuris vulgaris*. Ann. Botany **22**, 449—457 (1958).

Wohlfarth-Bottermann, K. E.: Die Kontrastierung tierischer Zellen und Gewebe im Rahmen ihrer elektronenmikroskopischen Untersuchung an ultradünnen Schnitten. Naturwissenschaften **44**, 287—288 (1957).

Wulff, Th.: Plasmodesmenstudien. Archiv Bot. **5**, 1—20 (1905).

— Plasmodesmenstudien. Öst. Bot. Z. **56**, 1—8, 60—69 (1906).

Ziegenspeck, H.: Anlage und Teilung der Tüpfel des sich stark streckenden Grundgewebes im Lichte der Dichroskopie. Phyton **4**, 300—310 (1952).

— Der Nachweis feinster Fila bei der Tüpfelbildung in sich streckenden Zellen mit Hilfe dichroitischer Färbung. Mikroskopie **8**, 121—126 (1953).

Dr. Reta Krull,
Botanisches Institut der Universität,
Bonn a. Rh., Meckenheimer Allee 170

Planta 55, 630—636 (1960)

Aus dem Max Planck-Institut für Züchtungsforschung, Erwin Baur-Institut, Köln-Vogelsang

ÜBER DIE GESTEIGERTE PEROXYDASEAKTIVITÄT IN GESTÖRTEN *PHASEOLUS*-ARTBASTARDEN

Von

PAUL SCHWARZE

Mit 3 Textabbildungen

(Eingegangen am 5. September 1960)

Abnorme physiologische Zustände können durch eine gesteigerte Peroxydasereaktion gekennzeichnet sein. So nimmt die Peroxydasereaktion in isolierten Blättern zu, wenn diese verdunkelt werden. Sie ist ferner gesteigert in *Epilobium*- und *Phaseolus*-Artbastarden, soweit diese Wachstumshemmungen zeigen (ROSS 1942 bzw. GEERTS 1949 und SCHWARZE 1954). Im ersten Fall ist sie Kennzeichen eines durch extreme äußere Bedingungen aufgezwungenen Stoffwechsels, im zweiten Fall tritt sie als Merkmal eines aus inneren Ursachen — Zusammentreffen zweier nicht aufeinander eingespielter Genome — abnormen Stoffwechsels auf. Um zu einem Verständnis des Phänomens zu gelangen, wurde die Frage geprüft, ob die Steigerung der Peroxydasereaktion auf einer Vermehrung des Enzyms oder lediglich einer Steigerung seiner Aktivität beruht. Die im folgenden beschriebenen Experimente beschränken sich auf Untersuchungen an *Phaseolus*-Artbastarden.

Material und Methode

Es wurden für die Untersuchungen folgende von Herrn Prof. RUDORF aus seinem Material überlassene Pflanzen benutzt: *Phaseolus vulgaris*, Sorte „Abessinische Auslese", normale und gestörte F_1-Bastarde zwischen *Phaseolus vulgaris* und *Phaseolus coccineus*, bei deren Herstellung die erstgenannte Art als Mutter verwendet wurde.

Die Peroxydasebestimmungen wurden nach der von GUTHRIE (1931) angegebenen und von ROSS (1942) und SCHWARZE (1954) weiterentwickelten Indophenolblaumethode durchgeführt.

Ergebnisse

1. Es wurden Homogenate von normalen und gestörten Bastarden in gleichen Volumteilen gemischt. Die Analyse ergab eine Peroxydaseaktivität, die ziemlich genau der Summe der Aktivitäten beider Extrakte entsprach (Abb. 1). Wäre für die gesteigerte Peroxydasereaktion der gestörten Bastarde ein Aktivator verantwortlich, so müßte die Aktivität des Gemisches größer sein, es sei denn, der Aktivator ist in einer Menge vorhanden, die gerade für die Aktivitätssteigerung der im gestörten

Bastard enthaltenen Peroxydasemenge ausreicht. Andererseits kann die niedrige Aktivität des normalen Bastards nicht durch einen Hemmstoff bedingt sein, da die Peroxydase des gestörten Bastards im Mischungsversuch keine Minderung erfährt.

II. Gereinigte Peroxydase erleidet, wenn sie Extrakten aus *Phaseolus vulgaris* und Extrakten aus gestörten Bastarden zugesetzt wird, nur eine geringfügige Aktivitätsänderung. In beiden Fällen ist die Aktivität etwas schwächer als die Summe derjenigen aus zugesetzter und der im Extrakt vorhandenen Aktivität (Abb. 2). Die Befunde sprechen also dagegen, daß Aktivatoren oder Inhibitoren für die unterschiedliche Peroxydasereaktion von gestörten Bastarden und Elternarten oder normalen Bastarden verantwortlich sind.

III. Aus Homogenaten von *Phaseolus vulgaris* und gestörten Bastarden wurde das Eiweiß mit Ammonsulfat (95%ige Sättigung) ausgefällt. Die Niederschläge wurden mit Ammonsulfatlösung 95%iger Sättigung

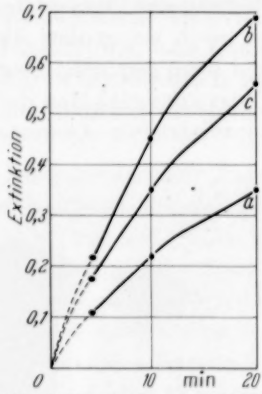


Abb. 1. Peroxydaseaktivität in Homogenaten eines normalen und eines gestörten Bastards und im Gemisch beider Homogenate. Blattfrischsubstanz im Mörser mit Sand zerrieben und Reibsel in 500 Teilen destillierten Wassers suspendiert. 5 ml Suspension für Bestimmung benutzt. Im Mischungsversuch beide Suspensionen im Verhältnis 1 : 1 gemischt. *a* Normaler Bastard; *b* gestörter Bastard; *c* Gemisch

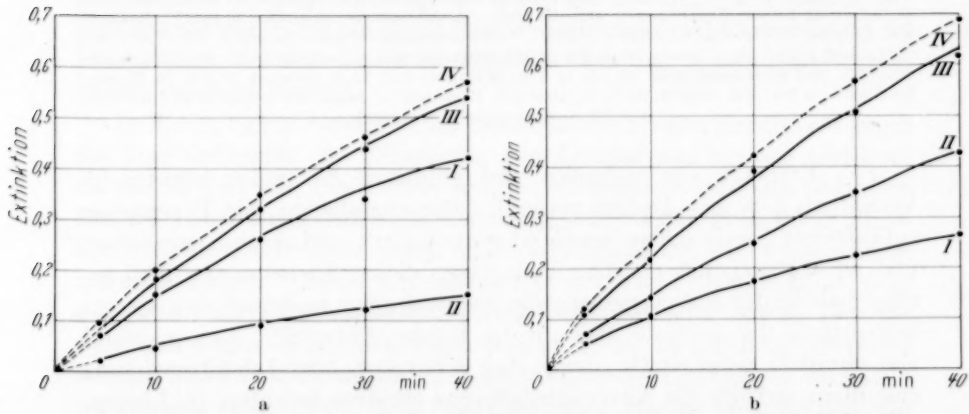


Abb. 2. Einfluß von Phaseolus-Blatthomogenaten auf die Aktivität gereinigter Peroxydase (BOEHRINGER). *I* Verdünntes Blatthomogenat; *II* Peroxydaselösung; *III* Aktivität des Gemisches im Experiment; *IV* berechnete Aktivität (*I* + *II*). a Versuch mit *Phaseolus vulgaris*; b Versuch mit gestörtem Bastard. Für die Mischungsversuche wurden Blatthomogenate und Peroxydaselösungen der doppelten Konzentration benutzt

gewaschen und suspendiert. *In beiden Fällen* hatte die Ausfällung einen Aktivitätsverlust zur Folge, bei *Phaseolus vulgaris* um etwa 20, beim

gestörten Bastard um etwa 5%. Diese Aktivitätsminderung dürfte auf unvollständiger Ausfällung der Peroxydase oder einer teilweisen Zerstörung des Enzyms beruhen. Auch nach der Ammonsulfatbehandlung ist noch ein großer Aktivitätsunterschied zwischen *Phaseolus vulgaris* und dem gestörten Bastard vorhanden. Wenn also die unterschiedliche Peroxydasereaktion durch Effectoren bedingt wäre, so müßten diese in konzentrierter Ammonsulfatlösung unlöslich sein.

Abb. 3. Elektrophorese von Extrakten aus Blättern von gestörten Bastarden und *Phaseolus vulgaris*. Blattsubstanz (1 Teil) mit Puffer (3 Teile) im Mörser zerrieben; Suspension zur Entfernung grober Zelltrümmer zentrifugiert. Aufgetragene Mengen: 20 mm³ (Bastard) und 40 mm³ (*Phaseolus vulgaris*). Puffer: Pyridin-Eisessig-Wasser-Gemisch (10 : 0,4 : 89,6); Spannung 420 Volt; Dauer der Elektrophorese 30 min. Lufttrockene Streifen nacheinander mit Benzidinlösung (0,1 % in Äthylalkohol) und H_2O_2-Lösung (0,5 % in Wasser) besprüht. *a* Bastard, aktiver Saft, a_K Bastard, Kochsaft. *b Phaseolus vulgaris*, aktiver Saft, b_K *Phaseolus vulgaris*, Kochsaft

IV. Extrakte aus normalen und gestörten Bastarden wurden im Verhältnis 1 : 9 mit Aceton versetzt. Der ausfallende, die Peroxydase enthaltende Niederschlag wurde abzentrifugiert, mit Aceton gewaschen und wieder suspendiert. Die Aktivitäten dieser Suspensionen sind geringer als die der Ausgangssuspensionen, doch zeigt auch nach der Acetonbehandlung der gestörte Bastard die höhere Aktivität. Aceton bringt also ebenfalls keine Stoffe, denen eine Aktivator- oder Inhibitorwirkung zukommt und die die Aktivitätsdifferenz erklären könnten, in Lösung. Der beobachtete Aktivitätsverlust in beiden Fällen kommt dadurch zustande, daß unter den gewählten Bedingungen die Peroxydase nicht quantitativ ausgefällt wird; denn auch reine Peroxydase, die in der gleichen Weise mit Aceton behandelt wurde, verlor einen Teil der Aktivität, und zwar, wie sich zeigen ließ, durch unvollständige Ausfällung.

V. Schließlich ist mit der Möglichkeit zu rechnen, daß peroxydatisch wirksame Stoffe nichtenzymatischer Natur für den Anstieg der Peroxydasereaktion im gestörten Bastard verantwortlich sind: Kochsäfte von gestörten Pflanzen zeigten jedoch immer eine ebenso schwache Aktivität wie die nichtgestörter. Die Hitzelabilität spricht für Enzyme, doch könnten natürlich auch, was aber wiederum nicht sehr wahrscheinlich ist, peroxydatisch wirksame hitzeempfindliche Stoffe nichtenzymatischer Natur vorliegen.

VI. Durch Papierelektrophorese in Pyridin-Essigsäure-Puffer kann Peroxydase abgetrennt werden. Mit Hilfe des Benzidintestes oder anderer Reaktionen läßt sich das Enzym auf dem Papier nachweisen (Abb. 3). Unterwirft man Kochsäfte der Elektrophorese, so fällt die Hauptbande aus oder ist nur wenig ausgeprägt, während andere, später auftretende Banden, die von nichtenzymatischen Verbindungen herrühren, erhalten bleiben. Die Peroxydasezone ist bei Extrakten aus gestörten Bastarden immer stärker ausgebildet als bei Extrakten aus normalen Pflanzen. Grundsätzlich das gleiche Ergebnis wurde erhalten, wenn die Peroxydase durch Besprühen des Streifens mit Nadireagenz sichtbar gemacht wurde. Auch diese Befunde sprechen für eine Vermehrung der Peroxydasemenge im gestörten Bastard; denn es ist nicht sehr wahrscheinlich, daß Enzym und Effector im elektrischen Feld mit der gleichen Geschwindigkeit wandern.

Besprechung der Ergebnisse

Alle mitgeteilten Befunde sind nur indirekte Beweise für eine Vermehrung der Peroxydasemenge im gestörten Bastard. Der exakte Beweis könnte nur durch eine quantitative Isolierung und Bestimmung der Peroxydase, die aber aus methodischen Gründen nicht durchführbar waren, erbracht werden.

Da die mit ganz verschiedener Methodik erhaltenen Ergebnisse gegen das Vorhandensein von Effectoren, von Aktivatoren bei den gestörten Bastarden und von Inhibitoren bei den Elternarten und den normalen Bastarden, sprechen, darf es als erwiesen gelten, daß die hohe Peroxydaseaktivität bei den ersteren durch eine Vermehrung der Peroxydasemenge zustande kommt. Dieser Unterschied in der Peroxydasereaktion zeigt sich, wenn auf Frischsubstanz, Trockensubstanz oder Eiweiß bezogen wird. Im letzten Fall ist er besonders groß, da die gestörten Bastarde weniger Eiweiß als die normalen Bastarde oder die Elternarten enthalten (Schwarze 1954, 1960). Der Eiweißkomplex, der im wesentlichen mit dem Enzymkomplex gleichgesetzt werden kann, ist also, was den Peroxydaseanteil anbetrifft, bei den gestörten Bastarden anders zusammengesetzt als bei den normalen Bastarden und den Elternarten. In einer späteren Arbeit wird dargelegt werden, daß dies auch für eine Reihe anderer Enzyme zutrifft.

Nach Untersuchungen von RUDORF (1954) sind besondere Kerngene von *Phaseolus coccineus* für das Auftreten der gestörten Bastarde verantwortlich. Die geschilderten Befunde geben aber noch keinen Einblick in die Reaktionskette, die von diesen Genen zur stärkeren Peroxydaseproduktion führt. Eine Reihe von Beobachtungen spricht für einen ursächlichen Zusammenhang letzterer mit der Hemmung der Chlorophyllsynthese bei den gestörten Bastarden und ihrer Neigung zum Eiweißabbau: Das nicht für die Chlorophyllbildung benötigte Protoporphyrin steht für die Synthese anderer Porphyrinverbindungen, in diesem Fall die Synthese des Coenzyms der Peroxydase zur Verfügung, und die Bildung des Peroxydaseapoenzyms, eines Eiweißes mit dem sehr niedrigen Molekulargewicht von 44000, ist möglicherweise (gegenüber Eiweißen mit dem vielfachen Molekulargewicht) im protoplasmatischen Milieu der gestörten, zum Eiweißabbau neigenden Bastarde begünstigt.

Für den physiologischen Effekt mag es gleichgültig sein, ob Differenzen in der Enzymaktivität durch unterschiedliche Enzymmenge oder durch unterschiedlichen Gehalt an Effectoren bedingt sind. Sollen jedoch physiologische Phänomene, bei denen Aktivitätsänderungen der Enzyme eine Rolle spielen, analysiert werden, so muß die Prüfung der Frage, ob Effectoren oder Enzymmenge dafür verantwortlich sind, an erster Stelle stehen.

Es ist noch nicht möglich, die Aktivität eines Enzyms *in der Zelle* genau zu bestimmen, es ist auch nicht möglich, diese Bestimmung in vitro durchzuführen, da das natürliche Wirkungsmilieu unbekannt ist und schon deshalb nicht reproduziert werden kann. In die Gewebehomogenate und -extrakte gehen Stoffe ein, die, wie die zahlreichen Inhaltsstoffe der Vacuole, in vitro getrennt von den Enzymen lokalisiert sind, bei Vermischung mit den Enzymen jedoch deren Aktivität im positiven und negativen Sinn wesentlich beeinflussen können. Maßnahmen zur Reinigung und Isolierung der Enzyme führen in der Regel zu unkontrollierbaren Verlusten.

Von den beiden wichtigen Faktoren der Enzymaktivität, der Enzymmenge und den Enzymeffectoren, läßt sich am ehesten die erstere quantitativ bestimmen, wenn, wie in den geschilderten Versuchen, die Beteiligung von Effectoren ausgeschlossen werden kann. Im Hinblick auf die enge Beziehung zwischen Gen und Enzym ist die Enzymmenge bei Untersuchungen an genetisch interessanten Objekten zweifellos eine sehr wichtige Größe.

Die gesteigerte, auf einer Vermehrung der Enzymmenge beruhende Peroxydasereaktion ist ein markantes Merkmal der gestörten Phaseolus-Bastarde. Es ist wahrscheinlich, daß ihr auch ein starker physiologischer Effekt entspricht und viele der abnormen Stoffwechselmerkmale und andere Eigenschaften damit in ursächlichem Zusammenhang stehen.

Untersuchungen der letzten Jahre haben gezeigt, daß die Peroxydase im Zusammenspiel mit Mn^{++}-Ionen und bestimmten Phenolen Stoffe wie β-Indolylessigsäure, Coenzym I und II (DPNH bzw. TPNH) und eine Reihe physiologisch wichtiger Dicarbonsäuren (Oxal-, Oxalessig- und Ketomalonsäure zum Beispiel) zu oxydieren vermag (Zusammenfassung der Literatur bei BURRIS 1960). Allein diese Erkenntnis rechtfertigt Untersuchungen über das Zustandekommen der hohen Peroxydaseaktivität bei den gestörten Bastarden und über die Ursachen des Aktivitätsanstieges, wie er bei der natürlichen Blattalterung (SCHWARZE 1959) und bei der Verdunklung isolierter Blätter (SCHUHMACHER 1928, SCHWARZE 1954) beobachtet wird.

Zusammenfassung

Es werden Beweise dafür erbracht, daß die Vermehrung der Peroxydaseaktivität in gestörten *Phaseolus*-Artbastarden nicht auf der Anwesenheit eines Aktivators, sondern auf der Vermehrung der Enzymmenge beruht:

Wird das Blatthomogenat eines normalen Bastards mit dem eines gestörten gemischt, so entspricht die Aktivität des Gemisches der Summe der Aktivitäten der einzelnen Homogenate.

Wird gereinigte Peroxydase Homogenaten von *Phaseolus vulgaris* und gestörten Bastarden zugesetzt, so erfährt deren Aktivität in beiden Fällen nur eine geringfügige Minderung.

Die Aktivitätsdifferenz zwischen der Elternart *Phaseolus vulgaris* und dem gestörten Bastard, die etwa der zwischen normalem und gestörtem Bastard entspricht, bleibt in der Größenordnung erhalten, wenn die in Ammonsulfatlösung 95%iger Sättigung löslichen Stoffe abgetrennt werden. Auch konzentriertes wäßriges Aceton bringt keine Stoffe in Lösung, die für die Aktivitätsdifferenz verantwortlich sein könnten. In beiden Fällen tritt ein Aktivitätsverlust ein, der auf einer teilweisen Inaktivierung oder, was wahrscheinlicher ist, auf einer unvollständigen Ausfällung der Peroxydase beruht.

Erhitzen im siedenden Wasserbad beseitigt bei normalen und gestörten Bastarden die Aktivität bis auf einen kleinen, geringfügigen Rest. Es sind also keine hitzestabilen Stoffe nichteiweißartiger Natur vorhanden, die die unterschiedliche Aktivität verursachen.

Durch Elektrophorese in Pyridin-Essigsäure-Puffer läßt sich bei normalen und gestörten Pflanzen eine Zone abtrennen, die mit dem Benzidin- und dem Indophenolblautest die Peroxydasereaktion gibt. Die Reaktion fällt beim gestörten Bastard sehr viel stärker aus als bei der Elternart *Phaseolus vulgaris*. Kochsäfte geben nur eine schwache bzw. keine Reaktion.

Die Befunde und ihre Bedeutung für die Erklärung der Stoffwechselanomalien bei den gestörten Bastarden werden diskutiert.

Fräulein P. v. Römer danke ich für die sorgfältige Durchführung der Bestimmungen.

Literatur

Burris, R. H.: Hydroperoxydases (peroxidases and catalases). In Handbuch der Pflanzenphysiologie, Bd. 12. Herausgeb. W. Ruhland. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1960.

Geerts, S. J.: Orienterend onderzoek over de reuzen- en dwergplanten in F_1 en volgende generaties van *Phaseolus vulgaris* L. × *Phaseolus multiflorus* Lam. Groningen-Batavia: J. B. Wolter 1949.

Ross, H.: Über die Verschiedenheiten des dissimilatorischen Stoffwechsels in reziproken Epilobium-Bastarden und die physiologisch-genetische Ursache der reziproken Unterschiede. III. Über die jährlichen Variationen der Peroxydaseaktivität bei *Epilobium hirsutum* und die Unterschiede bei den Sippen. Planta (Berl.) **33**, 161—184 (1942).

Rudorf, W.: Neue Beobachtungen an Bastarden von *Phaseolus vulgaris* L. × *Phaseolus multiflorus* Lam. und *Ph. multiflorus* × *Ph. vulgaris*. Caryologia (Pisa) Suppl. **6**, 844—845 (1954).

Schuhmacher, W.: Ein Beitrag zur Kenntnis des Stoffwechsels panaschierter Pflanzen. Planta (Berl.) **5**, 161—231 (1928).

Schwarze, P.: Beziehungen zwischen Peroxydasereaktion, Eiweißspiegel und Chlorophyllbildung. Planta (Berl.) **44**, 491—502 (1954).

— Über die Fraktionierung des Protoplasmas von *Phaseolus*-Arten und *Phaseolus*-Artbastarden. Planta (Berl.) **55**, 451—460 (1960).

Dr. P. Schwarze,
Max Planck-Institut für Züchtungsforschung (Erwin Baur-Institut),
Köln-Vogelsang

Planta 55, 637—646 (1960)

Aus dem Botanischen Institut der Universität Tübingen

DER PHOTOTROPISMUS UND DAS LICHTABHÄNGIGE LÄNGENWACHSTUM DES HYPOKOTYLS VON *SINAPIS ALBA* L.

Von

H. Mohr und E. Peters

Mit 6 Textabbildungen

(Eingegangen am 13. September 1960)

1. Einleitung

Es ist lange Zeit üblich gewesen, den Phototropismus einer Sproßachse und den Lichteinfluß auf das Längenwachstum der Sproßachsen als eng verwandte Phänomene zu betrachten. Man hat allgemein angenommen (vgl. z. B. Du Buy und Nuernbergk 1932—1935), daß jede Strahlung, die das Längenwachstum einer Sproßachse beeinflußt, eine phototropische Reaktion verursacht, wenn sie einseitig oder einseitig stärker gegeben wird. Umgekehrt hat man oft postuliert, daß phototropisch unwirksames Licht das Längenwachstum der Sproßachse nicht beeinflußt. So hat z. B. Blaauw (1915) rotes, phototropisch unwirksames Beobachtungslicht für die Registrierung der sog. Lichtwachstumsreaktion bei *Helianthus* verwendet, und auch Specht (1960) nimmt bei der Untersuchung der Lichtwachstumsreaktion von Dikotylenkeimlingen an, daß Rotlicht (RG 1-Filter von Schott) unwirksam ist.

Offensichtlich sind diese Auffassungen falsch. Man kann das Hypokotylwachstum von *Sinapis alba* mit Hellrot oder Dunkelrot sehr stark hemmen, obgleich diese Strahlungsqualitäten, von der Seite gegeben, keinerlei Krümmungen induzieren. Diese Hemmung des Hypokotylwachstums durch längerwellige sichtbare Strahlung beruht ausschließlich auf einer Hemmung des Längenwachstums der Zellen, die das Hypokotyl aufbauen. Auch wenn wir diese längerwellige Strahlung (also Hellrot oder Dunkelrot) von der Seite geben, tritt diese Hemmung auf, ohne daß irgendeine Krümmung zu beobachten wäre. Diese Phänomene werden in der vorliegenden Arbeit näher beschrieben.

Im wesentlichen wollen wir in dieser Arbeit zeigen, daß die Beeinflussung des pflanzlichen Wachstums durch Licht und die phototropische Reaktion gänzlich verschiedenartige Erscheinungen sind, die man sauber voneinander trennen kann und muß. Ähnlich wie wohl bei den meisten dikotylen Keimlingen kann die Steuerung des Längenwachstums des Hypokotyls von *Sinapis alba* mit Hellrot oder mit Dunkelrot durchgeführt werden (Mohr 1957, 1959b), die phototropische Reaktion läuft

dagegen nur ab, wenn kurzwellige Strahlung (Blaulicht) einseitig gegeben wird (Bünning 1938, Mohr 1957).

2. Methodik

(vgl. hierzu die Angaben bei Mohr 1959a, b)

a) Material. Das verwendete Samenmaterial ist dasselbe wie in den vorangegangenen Arbeiten.

b) Bestrahlungsanlagen. Dunkelrot: Dunkelrot-Standardanlage mit Cellophankombination, vgl. Mohr und Schoser 1959. Hellrot: TL 40 W/15-Röhren von Philips, zusätzlich versehen mit 2 Lagen roten Du Pont-Cellophan. Blau: TL 40 W/18-Röhren von Philips. Weißlicht: Leuchtstoffröhren, Osram HNT bzw. Sylvania, Philips TL 6 W/33 AO 32.

Die Messung der Intensitäten erfolgte nach Mohr und Schoser (1959).

c) Der allgemeine Versuchsansatz. Alle Versuche werden bei 25° C durchgeführt. Die Samen werden auf 3 Lagen Keimpapier (Charybdis-Löschpapier 9142/11) in farblosen Kunststoffbehältern („Gerda"-Kühlschrankbehälter) ausgesät. Das Keimpapier wird vor der Saat 15 Std in Leitungswasser gequollen, dann wird das freie Wasser abgegossen. Pro Behälter werden 25 Samen etwa äquidistant auf 3 konzentrischen Kreisen mit Radius 2,5, 1,5 und 0,5 cm ausgesät. Nach der Saat werden 4 ml Leitungswasser zugefügt. Bei Beendigung der Versuche ist stets noch freies Wasser vorhanden. Die relative Luftfeuchtigkeit in den Behältern ist also während der Dauer der Versuche hoch und konstant. Wenn nicht anders angegeben, werden die Dosen sofort nach der Aussaat ins Licht gebracht und bis zur Auswertung im Dauerlicht gehalten. Die Auswertung erfolgt 72 Std nach der Aussaat.

d) Zur Auswertung der Versuche. Pro Dose werden die 18 längsten Keimlinge verwendet. Zunächst wird die Hypokotyllänge bestimmt. Die Hypokotyle, die dem Mittelwert am nächsten kommen, werden dann für die Messung der Zellänge verwendet. Hierzu wird das Hypokotyl in 3 mm lange Abschnitte geteilt. Diese werden nun mit dem Gefriermikrotom Modell 1200 der R. Jung AG, Heidelberg, längs geschnitten. Es stellte sich heraus, daß das Gewebe ohne Vorbehandlung beim Einfrieren platzt und deshalb keine brauchbaren Schnitte zustande kommen. Nach den Angaben von Romeis (1948) und Schultz-Brauns (1931, 1932) sowie nach unseren eigenen Erfahrungen erwies sich schließlich folgender Weg als günstig: Die Abschnitte werden in einer 5%iger Albuminlösung, die mit 0,9%iger NaCl-Lösung hergestellt wurde, entlüftet. Die Abschnitte werden als „luftleer" betrachtet, wenn sie am Boden des Entlüftungsgefäßes liegen bleiben. Sie können nun auf dem Gefriermikrotom mit Erfolg geschnitten werden. Meist werden 40 μ dicke Schnitte hergestellt. Diese werden dann ohne Deckglas mit dem Mikroskop betrachtet. — Für die Messung der Zellänge werden gewisse Rindenschichten verwendet. Betrachten wir einen Schnitt, der durch den Zentralzylinder geht (Abb. 1 und 2). Jede Schnitthälfte besteht, abgesehen vom Zentralzylinder, aus etwa 7 Zellschichten. Die an den Zentralzylinder grenzende und die 2 an die Epidermis anschließenden Schichten werden nicht verwendet. Zur Messung bleiben also die 4., 5. und 6. Zellschicht von der Epidermis aus gerechnet (Abb. 1). Die Zellen dieser 3 Schichten sind sehr gleichmäßig und einheitlich ausgebildet. Die Zellänge wird in relativen Einheiten (1 Einheit = 4,4 μ) angegeben.

e) Zur Berechnung der Ergebnisse. Für jeden Abschnitt wird der Mittelwert der Zellänge in den angegebenen Schichten bestimmt. Es stellte sich heraus, daß die Zellängen in den verschiedenen Teilen des Hypokotyls nicht konstant sind. Die

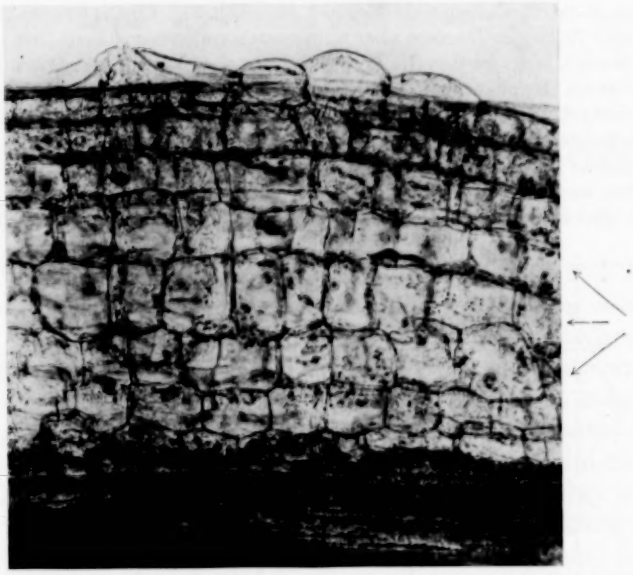


Abb. 1. Längsschnitt durch das Hypokotyl eines 72 Std alten Keimlings, der im Weißlicht (4300 lx) herangewachsen ist. Die Rindenzellen sind kurz. Die Pfeile kennzeichnen die zur Messung verwendeten Zellschichten (200 ×)

Abb. 2. Längsschnitt durch das Hypokotyl eines 72 Std alten Dunkelkeimlings. Die Rindenzellen sind lang (200 ×)

Zellen nehmen von der Radicula aus an Länge zu und erreichen ungefähr im Beginn des 2. Drittels des Hypokotyls ihre maximale Länge. Zur Plumula hin nimmt die

Zellänge dann wieder ab (als Beispiel die Abb. 3). Uns interessiert der Bereich maximaler Zellänge. Da man aber nicht genau voraussagen kann, wo im Hypokotyl dieser Bereich liegt, werden die Hypokotyle in allen Versuchen ganz durchgemessen. Bei längeren Hypokotylen werden die Abschnitte mit den größten Zellängen zusammengefaßt. Bei den Dunkelkontrollen z. B. (vgl. Abb. 3) werden von den 10 Abschnitten die 3 mit den längsten Zellen zusammengefaßt. Die Werte dieser 3 Abschnitte liegen immer dicht zusammen und weichen von denjenigen der vorangehenden und der folgenden Abschnitte erheblich ab. Eine Zusammenfassung erscheint also berechtigt. Sind die Hypokotyle kürzer (z. B. ergeben die mit Weiß-

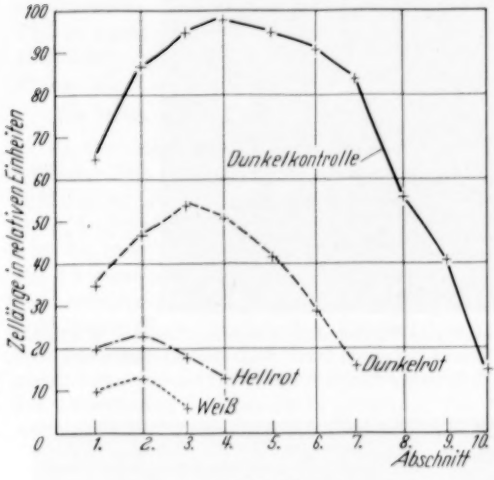


Abb. 3

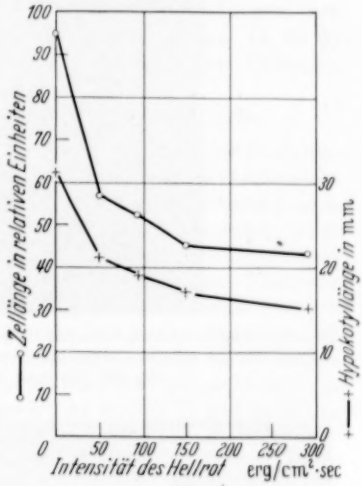


Abb. 4

Abb. 3. Die relative Zellänge 72 Std nach Aussaat in den einzelnen Abschnitten eines repräsentativen Hypokotyls bei verschiedenen Lichtqualitäten (72 Std Dauerlicht). Die Intensitäten der verschiedenen Spektralbereiche waren nicht gleich. Der Abschnitt 1 grenzt an die Radicula

Abb. 4. Hypokotyllänge und relative Länge der verwendeten Hypokotylzellen in Abhängigkeit von der Strahlungsintensität bei einseitiger Bestrahlung mit Hellrot

licht bestrahlten nur 3 Abschnitte), dann wird der Wert für den einen Abschnitt, der die längsten Zellen hatte, als maximaler Wert genommen, im Fall von 7 Abschnitten z. B. (Dunkelrot-Beispiel in Abb. 3) werden die 2 Abschnitte mit den längsten Zellen zusammengefaßt.

Unser L_Z, die maximale Zellänge, ist stets der Mittelwert aus mehreren Hypokotylen. L_H ist die mittlere Hypokotyllänge der Population. Es interessiert uns besonders, wie sich unter dem Einfluß der verschiedenen Behandlungen der Quotient L_Z/L_H ändert. Wenn man statt der maximalen Zellänge die (statistisch ungünstige) mittlere Zellänge im Hypokotyl verwendet, treten im Prinzip entsprechende Relationen auf.

f) Fehlerbetrachtung. Für L_Z bzw. L_H wird der mittlere Fehler m des arithmetischen Mittels folgendermaßen berechnet: m_Z (bzw. m_H) $= \pm \sqrt{\frac{\sum \Delta^2}{n\,(n-1)}}$, wobei Δ die Abweichung des Einzelmeßwerts vom arithmetischen Mittel ist. Wie sich diese mittleren Fehler auf den mittleren Fehler m_Q des Quotienten $Q = L_Z/L_H$

auswirken, wird — ähnlich wie bei Mohr (1956) — mit Hilfe des Gaußschen Fehlerfortpflanzungsgesetzes festgestellt. Es gilt:

$$m_Q = \pm \sqrt{\left(m_Z \cdot \frac{1}{L_H}\right)^2 + \left(m_H \cdot \frac{L_Z}{(L_H)^2}\right)^2}.$$

Die Mittelwerte L_Z wurden stets aus mehreren Hundert Meßwerten gebildet; den Mittelwerten L_H liegen mindestens 18 Meßwerte zugrunde.

3. Experimentelle Resultate

a) Im einseitigen Hellrot oder Dunkelrot tritt niemals eine Krümmung ein, obgleich die Hemmung des Hypokotylwachstums sehr ausgeprägt ist. Man könnte sich nun vorstellen, daß die photochemische Reaktion, die das längerwellige Licht auslöst, bei den angewandten Intensitäten stets auf beiden Flanken des Hypokotyls mit maximaler Geschwindigkeit abläuft und deshalb keine Krümmung eintritt. Dieser Einwand wird durch die Abb. 4 behoben. Man sieht, daß wir Intensitäten anwenden, bei denen die Hellrot-Reaktion keineswegs saturiert ist. Da die Hypokotyle fast lichtundurchlässig sind, besteht zwischen Licht- und Schattenflanke sicherlich ein starker Strahlungsgradient, und die durch Hellrot bewirkte photochemische Reaktion läuft sicherlich auf den beiden Flanken mit verschiedener Geschwindigkeit ab. Wir haben auch noch geringere Intensitäten als die in der Abb. 4 angegebenen geprüft, bis hinunter zu Intensitäten, die das Hypokotylwachstum kaum noch beeinflussen. Eine feststellbare Krümmung kam nie zustande. Sobald aber kurzwelliges Licht (Blaulicht) zusammen mit Hellrot oder allein seitlich gegeben wurde, trat die phototropische Krümmung ein.

In der Abb. 4 ist auch angegeben, daß die Hemmung des Hypokotylwachstums durch Hellrot auf einer Hemmung des Zellängenwachstums beruht. Diese Verhältnisse sind im nächsten Abschnitt genauer dargestellt.

b) Die Frage ist, warum im einseitigen Hellrot keine Krümmung zustande kommt. Um bei der Diskussion dieser Frage weiterzukommen, erschien es uns von Bedeutung, festzustellen, ob die verschiedenen Lichtqualitäten, Hellrot, Dunkelrot oder Blau, ebenso wie „Weißlicht", über eine Hemmung des Zellwachstums oder der Zellteilung die Hemmung des Hypokotylwachstums bewirken. Es hat sich gezeigt, daß alle Lichtqualitäten das Längenwachstum des Hypokotyls in erster Linie über das Längenwachstum der Hypokotylzellen beeinflussen. Die beobachteten Hemmungen beruhen ausschließlich auf Hemmungen des Zellwachstums. Diese Tatsachen wollen wir an einigen Beispielen demonstrieren (Abb. 5 und 6, vgl. auch Abb. 4). In den Abbildungen ist der Quotient relative Zellänge/Hypokotyllänge angegeben. Die Werte, die dieser Quotient annimmt, zeigen uns, daß zwar die Hemmung des Hypokotylwachstums auf einer Hemmung des Zellwachstums beruht, daß aber mit zunehmender

Intensität sowohl im phototropisch unwirksamen Dunkelrot als auch im phototropisch wirksamen Weißlicht die Zellteilung gefördert wird. — Das wesentliche Resultat unserer umfangreichen Untersuchungen, von denen wir hier nur Stichproben zeigen können, ist, daß sowohl photo-

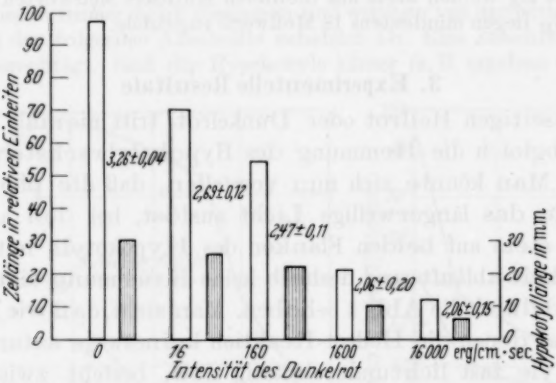


Abb. 5. Hypokotyllänge (gestreifte Säule) und relative Länge der verwendeten Hypokotylzellen in Abhängigkeit von der Intensität im Dunkelrot-Feld (Bestrahlung von oben). Die Zahlen neben den Säulen stellen den Quotienten relative Zellänge durch Hypokotyllänge dar ($L_Z : L_H$)

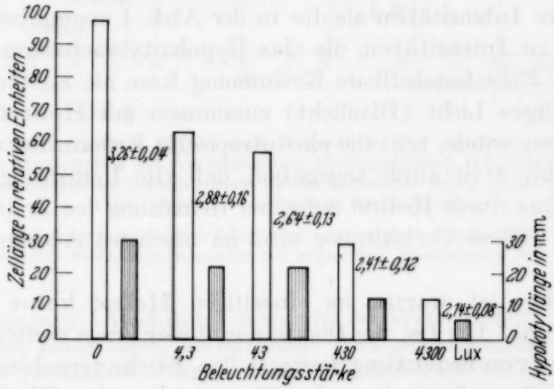


Abb. 6. Hypokotyllänge (gestreifte Säule) und relative Länge der verwendeten Hypokotylzellen in Abhängigkeit von der Lichtintensität im HNT-Weißlichtfeld (Bestrahlung von oben). Die Zahlen neben den Säulen stellen den Quotienten relative Zellänge durch Hypokotyllänge dar ($L_Z : L_H$)

tropisch wirksame als auch phototropisch unwirksame Strahlung in erster Linie das Längenwachstum der Zellen beeinflußt. — Warum bei einseitiger Belichtung im längerwelligen Licht keine Krümmung entsteht, bleibt unklar.

c) Die Vermutung liegt nahe, daß die für das Hypokotylwachstum entscheidende photochemische Reaktion im längerwelligen Licht in den Cotyledonen abläuft und daß von den Cotyledonen her sekundär ein

Einfluß auf die Sproßachse ausgeübt wird, der letztlich zu der Hemmung führt. Man könnte sich in diesem Fall vorstellen, daß dieser von den Cotyledonen kommende „Einfluß" so homogen über den Hypokotylquerschnitt verteilt wird, daß auch bei seitlicher Belichtung keine Krümmung entstehen kann. — Diese Möglichkeit wird ausgeschlossen, wenn wir den Lichteinfluß auf das Hypokotylwachstum nach Entfernung der Cotyledonen untersuchen. 48 Std nach der Aussaat (Anzucht im Dunkeln) werden im grünen „Sicherheitslicht" die Cotyledonen samt dem Vegetationspunkt in der Mitte des Plumula-Hakens abgeschnitten (Anfangswert). Dann werden die Hypokotyle 24 Std im einseitigen Dauerlicht gehalten, häufig auf Krümmungen hin beobachtet und anschließend gemessen. Die Resultate sind: Im einseitigen längerwelligen Licht tritt keine Krümmung auf, obgleich die Hypokotylstümpfe noch wachstumsfähig sind und obgleich die Hypokotylstümpfe durch dieses Licht in ihrem Längenwachstum gehemmt werden (Tabelle 1). Im einseitigen Weißlicht dagegen krümmen sich die Hypokotylstümpfe zum Licht hin, während die Wachstumsbeeinflussung sehr ähnlich ist wie im Hellrot (vgl. hierzu Tabelle 2).

Tabelle 1. *Das Wachstum der Hypokotylstümpfe im einseitigen Hellrot (Intensität hinter 2 mm KG 1: 19 erg/cm² · sec)*

Angegeben sind die Längen der Hypokotyle 72 Std nach Aussaat (mm).

Anfangswert (48 Std nach Aussaat)	14,86 ± 0,30
Cotyledonen entfernt, belichtet . .	15,80 ± 0,34
Cotyledonen entfernt, unbelichtet .	17,92 ± 0,41
Kontrolle, belichtet	25,10 ± 0,51
Kontrolle, unbelichtet	29,16 ± 0,49

Tabelle 2. *Das Wachstum der Hypokotylstümpfe im einseitigen Weißlicht [Silvania, 6 W, Intensität (hinter 2 mm KG 1):128 erg/cm² · sec]*

Angegeben sind die Längen der Hypokotyle 72 Std nach Aussaat (mm).

Anfangswert (48 Std nach Aussaat)	14,56 ± 0,47
Cotyledonen entfernt, belichtet . .	15,86 ± 0,44
Cotyledonen entfernt, unbelichtet .	17,94 ± 0,72
Kontrolle, belichtet	24,47 ± 1,04
Kontrolle, unbelichtet	29,69 ± 0,63

Wir gelangen also zu dem Ergebnis, daß auch die Hypokotylstümpfe in ihrem Wachstum durch einseitiges Hellrot gehemmt werden können, ohne daß eine Krümmung eintritt. Die Hemmung des Hypokotylwachstums durch längerwelliges Licht kann also grundsätzlich auch ohne die Mitwirkung der Cotyledonen zustande kommen. — Es bleibt also die Frage offen, wie das einseitige längerwellige Licht das Hypokotylwachstum hemmt, ohne daß eine Krümmung eintritt.

4. Diskussion

Es ist sicher, daß der Beeinflussung des Längenwachstums der *Sinapis*-Hypokotyle durch längerwellige Strahlung und der photo-

tropischen Reaktion dieser Hypokotyle gänzlich verschiedenartige photochemische Reaktionen zugrunde liegen. Das Längenwachstum wird über das reversible Hellrot-Dunkelrot-Reaktionssystem und über das Blau-Dunkelrot-Reaktionssystem gesteuert (Mohr 1957, 1959), der phototropischen Reaktion liegt ein Pigmentsystem zugrunde, das nur im Blaubereich absorbiert (Bünning 1938, Mohr 1957, 1960).

Die wesentliche Frage, die uns durch die vorliegende Arbeit begleitet, wollen wir uns noch einmal klar stellen: Wie kann man sich erklären, daß einseitige Strahlung zwar das Längenwachstum der Hypokotylzellen hemmt, aber trotz eines starken Strahlungsgradienten und trotz fehlender Saturierung der photochemischen Reaktion keinerlei Krümmung des Organs verursacht. — Eine Möglichkeit der Erklärung ist die folgende: Es ist neuerdings gefunden worden (Mitchell u. Mitarb. 1960, Lockhart 1960a), daß bei vielen Pflanzen einseitig applizierte Gibberellinsäure zu einem starken Längenwachstum der Sproßachse führt, ohne daß Krümmungen auftreten. Offenbar ist es so, daß diese Substanz sehr rasch homogen über den Sproßquerschnitt verteilt wird, wenn sie an einer Stelle des Querschnitts eingeführt wird. Nach den Untersuchungen von Lockhart (1956, 1959, 1960b) und Lockhart und Gottschall (1959) über die Aufhebung der Hemmwirkung längerwelligen Lichts beim Längenwachstum von Sproßachsen durch Gibberellinsäure könnte man annehmen, daß das längerwellige Licht bei *Sinapis* auf irgendeine Weise die endogene Gibberellinsäure, die der limitierende Faktor des Wachstums ist, reduziert und dadurch das Längenwachstum der Zellen hemmt. Da nun offenbar die Gibberellinsäure stets homogen über den Sproßquerschnitt verteilt ist, führt auch eine einseitige Reduzierung der Gibberellinsäure durch einseitige Bestrahlung nur zu einer Reduktion der Gesamtmenge, wobei die homogene Verteilung praktisch erhalten bleibt. Auf diese Weise können wir uns leicht verständlich machen, weshalb einseitiges längerwelliges Licht das Längenwachstum als Ganzes hemmt, ohne daß eine Krümmung zustande kommt.

Bei der zum Phototropismus führenden Blaulichtwirkung dagegen bleibt die Strahlungswirkung lokalisiert. Deshalb werden, wie man im Längsschnitt leicht beobachten kann, die auf der Lichtseite gelegenen Zellen mehr in ihrem Längenwachstum gehemmt als die Zellen auf der Schattenseite. Man darf vermuten (vgl. Mohr 1960), daß das der phototropischen Reaktion bei den Dikotylen-Keimlingen zugrunde liegende Pigmentsystem mit dem entsprechenden Photoreceptor der *Avena*-Koleoptile (Shropshire und Withrow 1958) und vielleicht auch mit dem wirksamen Pigment bei *Phycomyces* übereinstimmt (Delbrück und Shropshire 1960).

Zusammenfassend sei festgestellt: Die Beeinflussung des Längenwachstums pflanzlicher Organe im Sinne einer Etiolementverhinderung

durch Licht und die Auslösung der phototropischen Krümmung sind — zumindest bei Dikotylenkeimlingen — weitgehend getrennte Phänomene. Sowohl phototropisch wirksames Blaulicht wie auch längerwelliges Licht beeinflussen das Längenwachstum der Hypokotylzellen, aber über ganz verschiedene Mechanismen.

Summary

Lengthening of the hypocotyl of *Sinapis alba* L. is mainly controlled by the longer wave lengths of visible radiation, whereas a phototropic curvature of the hypocotyl can only be induced by the shorter wave lengths of visible radiation. In all regions of the visible spectrum inhibition of hypocotyl lengthening is due exclusively to an inhibition of cell lengthening.

The main question is why no bending occurs with unilateral visible radiation at longer wave lengths in spite of the fact that the reaction is not saturated, and that a strong gradient of radiation exists between the light side and the shaded side of the hypocotyl.

A hypothesis has been presented to explain these facts. It has been assumed that long wave length visible light reduces the level of endogenous gibberellins. It is known from the literature that in stems of many plants gibberellic acid is translocated laterally so rapidly after an unilateral application that the compound induces the entire stem to elongate more or less uniformly without pronounced curvature. In this way it is understandable that unilateral visible radiation at longer wave lengths reduces the level of endogenous gibberellic acid without inducing a curvature. On the other hand the effect of unilateral blue light remains localized and is not translocated. A curvature is the result.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft sind wir für die Unterstützung unserer Arbeiten zu großen Dank verpflichtet. Herrn Dr. J. A. Lockhart, Pasadena, danken wir für anregende Diskussionen.

Literatur

Blaauw, A.H.: Licht und Wachstum. II. Z. Bot. **7**, 465—532 (1915).

Bünning, E.: Phototropismus und Carotinoide. III. Weitere Untersuchungen an Pilzen und höheren Pflanzen. Planta (Berl.) **27**, 583—610 (1938).

Buy, H.G. du, u. E. Nuernbergk: Phototropismus und Wachstum der Pflanzen. Ergebn. Biol. **9**, 358—544 (1932); **10**, 207—322 (1934); **12**, 325—543 (1935).

Delbrück, M., and W. Shropshire: Action and transmission spectra of *Phycomyces*. Plant Physiol. **35**, 194—204 (1960).

Lockhart, J.A.: Reversal of the light inhibition of the pea stem growth by the gibberellins. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) **42**, 841—848 (1956).

— Studies on the mechanism of stem growth inhibition by visible radiation. Plant Physiol. **34**, 457—460 (1959).

— Persönliche Mitteilung 1960a.

— Intracellular mechanism of growth inhibition by radiant energy. Plant Physiol. **35**, 129—135 (1960b).

Lockhart, J. A., and V. Gottschall: Growth responses of Alaska pea seedlings to visible radiation and gibberellic acid. Plant Physiol. **34**, 460—465 (1959).

Mitchell, J. W., I. R. Schneider and H. G. Gauch: Translocations of particles within plants. Science **131**, 1863—1870 (1960).

Mohr, H.: Die Abhängigkeit des Protonemawachstums und der Protonemapolarität bei Farnen vom Licht. Planta (Berl.) **47**, 127—158 (1956).

— Der Einfluß monochromatischer Strahlung auf das Längenwachstum des Hypokotyls und auf die Anthocyanbildung bei Keimlingen von *Sinapis alba* L. (= *Brassica alba* Boiss.). Planta (Berl.) **49**, 389—405 (1957).

— Der Lichteinfluß auf die Haarbildung am Hypokotyl von *Sinapis alba* L. Planta (Berl.) **53**, 109—124 (1959a).

— Der Lichteinfluß auf das Wachstum der Keimblätter bei *Sinapis alba* L. Planta (Berl.) **53**, 219—245 (1959b).

— Photomorphogenetische Reaktionssysteme in Pflanzen. 2. Teil: Der Einfluß kurzwelligen Lichts auf Wachstum und Entwicklung. Ergebn. Biol. **23**, 47—93 (1960).

—, u. G. Schoser: Eine Interferenzfilter-Monochromatoranlage für photobiologische Zwecke. Planta (Berl.) **53**, 1—17 (1959).

Romeis, B.: Mikroskopische Technik. München: Leibniz 1948.

Schultz-Brauns, O.: Eine neue Methode des Gefrierschneidens für histologische Schnelluntersuchungen. Klin. Wschr. **10**, 113—116 (1931).

— Verbesserungen und Erfahrungen bei Anwendung der Methode des Gefrierschneidens unfixierter Gewebe. Zbl. allg. Path. path. Anat. **54**, 225—234 (1932).

Shropshire, W., and R. B. Withrow: Action spectrum of phototropic tip-curvature of *Avena*. Plant Physiol. **33**, 360—365 (1958).

Specht, I.: Die phototropische Inversion dikotyler Keimlinge in ölartigen Medien. Flora (Jena) **149**, 106—161 (1960).

Prof. Dr. H. Mohr,
Botanisches Institut der Universität, Freiburg i. Br., Schänzlestr. 9

Planta 55, 647—668 (1960)

Aus dem Botanischen Institut der Universität München

DAS PHOTOTROPISCHE VERHALTEN DER BLÜTENSTIELE VON *CYCLAMEN PERSICUM* HYBR.

Von

HANS DIETMAR ZINSMEISTER

Mit 14 Textabbildungen

(Eingegangen am 24. August 1960)

A. Einleitung

Die Erscheinung, daß bei Blütenstielen in der postfloralen Periode eine phototropische Umstimmung vom positiven zum negativen Phototropismus erfolgt, kann bei Vertretern einiger Pflanzenfamilien beobachtet werden. Zum ersten Mal wies HOFMEISTER (1867) bei *Linaria Cymbalaria* auf dieses Phänomen hin, das von WIESNER (1878) genauer untersucht wurde.

Etwas später beschrieb DARWIN in „The Power of Movement in Plants" (1880) die gleiche Reaktion bei *Cyclamen persicum*. Er beobachtete, daß sich die aufrechtstehenden Blütenstiele, sobald die Samenkapseln zu schwellen beginnen, nach abwärts krümmen. Diese Krümmung unterbleibt jedoch dann, wenn die Stiele im Dunkeln stehen. Er schrieb deshalb diese Bewegung dem negativen Heliotropismus zu. Zu dem gleichen Ergebnis kam VÖCHTING (1882), er hält aber im Gegensatz zu DARWIN die Beteiligung eines positiven Geotropismus an dieser Bewegung für möglich.

OEHLKERS (1922) stellte später bei *Tropaeolum maius* fest, daß die negative phototropische Reaktion unmittelbar nach der Befruchtung durch neueinsetzendes, apikales Wachstum ausgelöst wird.

Die gleiche Beobachtung machte SCHMITT (1922) an *Linaria cymbalaria*. OEHLKERS erzielte auch bei jungen Blütenstielen von *Tropaeolum maius* negative phototropische Krümmungen, wenn er die Stiele vom Sproß abschnitt. Er interpretierte dies dahingehend, daß mit Beginn der Blüte die Stoffzufuhr aus dem Hauptsproß in den Blütenstiel gesperrt wird, was man künstlich durch das Abschneiden junger Blütenstiele vom Sproß erreicht. Der Verbrauch des noch vorhandenen, abgeschlossenen Reservestoffquantums soll nun eine Konzentrationsveränderung hervorrufen, welche die Voraussetzung für die Induktion einer negativen Krümmung schafft. SCHMITT erhielt mit jungen Blütenstielen von *Linaria cymbalaria* nach Entfernung der Narbe oder der Antheren ebenfalls eine Umstimmung zur negativen phototropischen Reaktion, die basal einsetzte, wie dies normalerweise nur nach einer

erfolgreichen Befruchtung der Fall ist. Der apikale Teil der Stiele krümmte sich allerdings nur nach tatsächlich erfolgter Befruchtung vom Licht weg. Die bisher gewonnenen Erkenntnisse gaben Veranlassung, in der folgenden Arbeit das Phänomen der phototropen Umstimmung an den Blütenstielen von *Cyclamen persicum* unter besonderer Berücksichtigung des Wuchsstoffhaushaltes zu untersuchen.

B. Material und Methodik

Sämtliche Versuche wurden mit Kulturrassen von *Cyclamen persicum* ausgeführt. Hierzu dienten ausschließlich 2 im Handel befindliche Sorten: *Cyclamen persicum forma alba* und *Cyclamen persicum* Hybr. „Perle von Ziehlendorf". Wie sich im Laufe der Versuche zeigte, ist für reizphysiologische Untersuchungen die letztere Rasse wesentlich geeigneter. Bei beiden Sorten treten jedoch trotz mehrjähriger Durchzüchtung Aufspaltungen auf, die bei quantitativen Versuchen störend wirken.

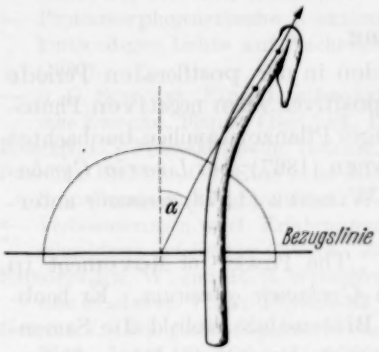


Abb. 1. Bestimmung des Krümmungswinkels

Meist waren 150—200 Stöcke verfügbar. Die Pflanzen standen in den Institutsgewächshäusern im allseitigen Licht bei einer Temperatur von 10—15°C. Stöcke, die vor allem Fruchtstiele liefern sollten, waren in einem wärmeren Gewächshaus untergebracht, da der Fruchtansatz unter anderem sehr wärmebedürftig ist. Die Versuchspflanzen wurden zur besseren Blütenentwicklung mit einem Phosphorpräparat (Handelsbezeichnung „Hakaphos") gedüngt. Die Blüten wurden, wenn möglich, bei Sonnenbestrahlung durch direkte Übertragung des Pollens auf die Narbe bestäubt. Der Prozentsatz an nichtbestäubten Blüten liegt, besonders in den sonnenarmen Wintermonaten, sehr hoch. Die erfolgte Befruchtung zeigt sich einige Tage nach der beschriebenen Behandlung durch das Abfallen der Korolle an.

Sämtliche Versuche wurden in einer Dunkelkammer bei einer durchschnittlichen Temperatur von 22°C ausgeführt. Als Raumbeleuchtung diente eine rote 40-Watt-Philips-Leuchtstoffröhre. Die Stiele wurden für die Lichtversuche vom Stock isoliert und mittels gespaltener Korken in 25-ml-Erlenmeyer-Kölbchen befestigt. Zur besseren Wasseraufnahme wurden die Stiele kreuzweise eingeschnitten. Vor Versuchsbeginn standen die Stiele mehrere Stunden noch im Dunkeln, um etwaige im Gewächshaus perzipierte Reize abklingen zu lassen. Junge Stiele wurden im knospentragenden Zustand, Fruchtstiele nach Abfall der Korolle verwendet.

Als Lichtquelle zur einseitigen phototropischen Reizung diente eine mattierte 200-W-Osram-Glühbirne. Zur Abschirmung der Wärmestrahlung wurde die Glühbirne in ein mit dest. Wasser gefülltes Glasgefäß getaucht, welches mittels einer an die Wasserleitung angeschlossenen Kupferschlange gekühlt wurde. Zur Verwendung kamen Lichtintensitäten zwischen 1000 und 10000 Lux, in den meisten Fällen aber 5000 Lux. Ihre Messung erfolgte mit einem Luxmeter von der Firma Lange. Die Stiele erhielten Dauerlicht bis zu 72 Std. Sie standen so vor der Lichtquelle, daß ihre ganze Länge bestrahlt wurde. Belichtet wurde stets die Lateral-

flanke, um eine Interferenz mit epinastischen bzw. geotropischen Krümmungen, die sich bei einer Reizung der Dorsal- oder Ventralflanke ergeben könnte, zu vermeiden. Die Registrierung der Krümmungen erfolgte anfangs durch Abzeichnen des Schattenrisses der Stiele, der mit einer orangefarbigen Birne auf einen mit Transparentpapier bespannten Glasschirm geworfen wurde. Später wurden die Stiele mittels einer Retina-Kamera aus einer Entfernung von 80 cm photographiert. Als Filmmaterial dienten Ferrania-Infrarotfilme von einer Empfindlichkeit von 14/10 Din. Bei der Auswertung der Filme mittels eines Lesegerätes für Kleinbildfilme konnte eine erhebliche Vergrößerung der Photographien erzielt werden. Die Krümmungen wurden direkt an den auf den Tisch projizierten Bildern ausgemessen. Als Maß der Krümmung diente stets die Winkelabweichung des obersten Abschnittes des Stieles von der Senkrechten (s. Abb. 1).

Zur Wuchsstoffbestimmung fanden der *Avena*-Krümmungstest und der *Avena*-Koleoptil-Cylindertest Verwendung. Für alle derartigen Versuche wurde der Hochzuchthafer „Flämings-Gold" von der Saatzuchtanstalt Weihenstephan verwendet[1]. Die Anzucht des Hafers erfolgte im feuchten Sägemehl in Tonschalen. Diese wurden in einen Dunkelkasten mit hoher Luftfeuchtigkeit bei einer Temperatur von 25°C gestellt. Nachdem die Haferkörner gut angekeimt waren, wurden sie 3 Std lang mit Rotlicht bestrahlt, um das Auswachsen des ersten Internodiums zu verhindern.

Sobald die Keimlinge eine Länge von 20—25 mm erreicht hatten, meist nach 3—4 Tagen, wurden sie für die in den einzelnen Abschnitten näher beschriebenen Teste verarbeitet. In fast allen Versuchen mit synthetischem Wuchsstoff wurde β-Indolyl-Essigsäure (IES) von der Firma Merck verwendet. Für alle Meßergebnisse wurde der mittlere Fehler nach folgender Formel errechnet:

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum d^2}{n\,(n-1)}}.$$

C. Die Versuche

1. Wachstum von jungen Stielen und von Fruchtstielen

Vor der Untersuchung der phototropischen Reaktion von jungen Stielen und von Fruchtstielen schien es notwendig, zuerst einen Überblick über die Wachstumsverhältnisse dieses Objektes zu gewinnen. Sämtliche Wachstumsmessungen wurden im Dunkeln ausgeführt. Die Stiele wurden mit einem Gemisch aus Paraffinöl und Kohle über ihre Gesamtlänge in Abständen von einigen Zentimetern markiert. Der Zuwachs wurde mehrere Tage hindurch alle 24 Std mit einem Stechzirkel gemessen und die entsprechenden Abstände auf Millimeterpapier abgetragen.

a) Junge Stiele. Die jungen Stiele waren vor Versuchsbeginn 12 bis 13 cm lang. Die untersten 3 cm, die zur Befestigung der Stiele benötigt wurden, konnten bei den Messungen vernachlässigt werden, da sich bei Vorversuchen ergab, daß diese Region kein merkliches Wachstum mehr zeigt. Ganz allgemein kann festgestellt werden, daß in diesem Stadium fast die ganze Stiellänge mit Ausnahme der erwähnten Basalzone am

[1] Für die freundliche Überlassung des Saatgutes danke ich Herrn Regierungsrat HERMANN von der Bayer. Saatzuchtanstalt Weihenstephan.

Wachstum teilnimmt (Abb. 2); bevorzugt ist dabei jedoch die Region vom 1. bis zum 5. cm unterhalb des Blütenbodens. Nur die oberste 1-cm-Zone wächst sehr schwach.

Wie aus Abb. 3a ersichtlich ist, stellen die abgeschnittenen Blütenstiele nach etwa 4 Tagen ihr Wachstum völlig ein, und die Knospen beginnen aufzublühen.

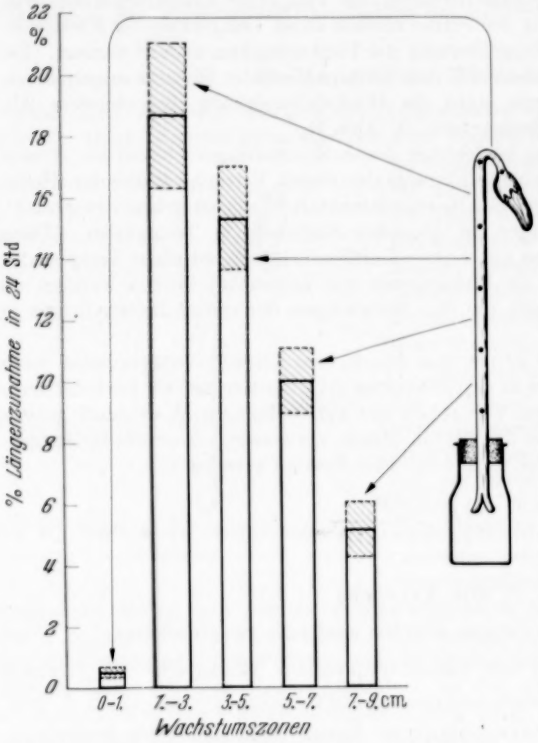


Abb. 2. Längenzunahme der einzelnen Wachstumszonen junger Blütenstiele. Schraffierte Felder: Einfacher mittlerer Fehler

Wenn man von jungen Stielen die Knospe abschneidet und statt dessen Röhrchen mit einer IES-Lösung (10^{-4} mol) aufsetzt, kann das Wachstum etwas länger aufrechterhalten werden (Abbildung 3b). Die Blütenknospe scheint also als Wuchsstoffquelle für den Stiel zu dienen. Ein weiteres Argument für diese Annahme ist, daß bei Stielen, die nach der Dekapitation nicht mit IES versorgt wurden, das Wachstum alsbald ganz erlosch. Die gleiche Situation findet sich beim Wachstum der Keimlinge von *Vicia* (DU BUY und NUERNBERGK 1932), bei welchen nach Abschneiden des Sproßgipfels das Wachstum ebenfalls zum Stillstand kommt. Dagegen unterscheidet sich das Verhalten junger Stiele von dem der *Avena*-Koleoptilen in einem wichtigen Punkt. Die Verteilung des Wachstums über die ganze Länge des Stieles ist zwar ähnlich, aber es findet hier keine Regeneration eines Auxinproduktionszentrums statt, wenn dieses entfernt wird.

b) Fruchtstiele. Wie bereits angedeutet wurde, ist in den Stielen vollentwickelter Blüten die erste Phase des Wachstums beendet. Sobald sich aber nach Abfall der Korolle ein erhebliches Anschwellen des Fruchtknotens zeigt, kommt eine zweite postflorale Wachstumsphase in Gang, die allerdings schwächer ist als die präflorale (Abb. 4). Gleichzeitig treten abwärts gerichtete Krümmungen auf. Ob diese Krümmungen

geotropischer oder epinastischer Natur sind, konnte noch nicht sicher ermittelt werden. Nach Angaben von VÖCHTING (1882) scheint an ihnen eine positive geotropische Komponente beteiligt zu sein, während

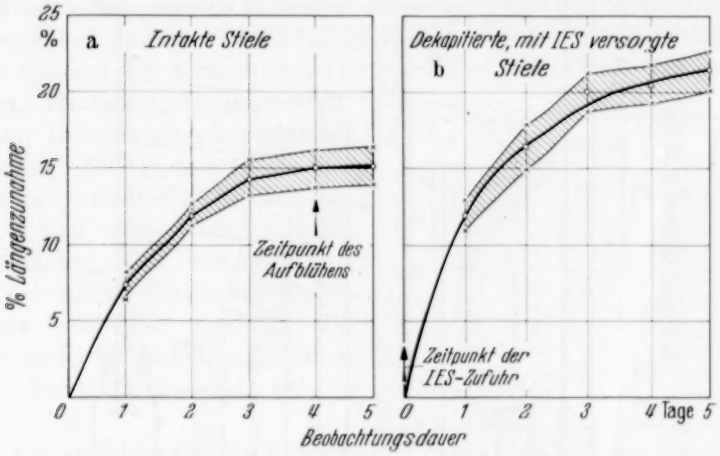


Abb. 3a u. b. a Gesamtwachstum junger, intakter Blütenstiele. b Gesamtwachstum junger Blütenstiele, die dekapitiert und sofort danach apikal durch Glasröhrchen mit 10^{-4} m IES versorgt wurden. Schraffiertes Feld: Band des einfachen mittleren Fehlers

KOSANIN (1930) ein Zustandekommen dieser Krümmung durch Epinastie allein für möglich hält. In der vorliegenden Arbeit werden diese Krümmungen, die im Gegensatz zu der phototropischen Reaktion auch im Dunkeln durch eine relativ stärkere Verlängerung der dorsalen Flanke zustande kommen, als aphototrop bezeichnet. In Abb. 4 und 5 sind die Zuwachswerte nur für einen Zeitraum von 24 Std angegeben, da zu einem späteren Zeitpunkt infolge der starken aphototropen Krümmungen eine genaue Messung nicht mehr möglich war.

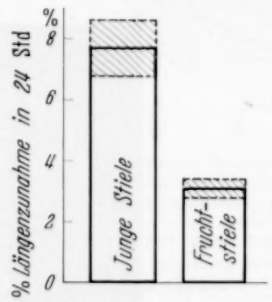


Abb. 4. Gesamtwachstum von jungen Blütenstielen und von Fruchtstielen. Schraffierte Felder: Einfacher mittlerer Fehler

In Abb. 4 sind die gesamten Längenzunahmen von jungen und von Fruchtstielen miteinander verglichen; Abb. 5 zeigt, daß auch bei Fruchtstielen das Wachstum wiederum fast über die ganze Länge verteilt ist. Im Gegensatz zu jungen Stielen treten jedoch hier in der oberen Hälfte 2 Wachstumsmaxima auf, die durch eine Zone schwächeren Wachstums im Bereich des 3.—6. cm voneinander getrennt sind. Das Vorkommen von 2 Hauptwachstumszonen beim postfloralen Wachstum wurde von OEHLKERS (1922) auch an *Tropaeolum maius* beobachtet. Das postflorale Wachstum von *Cyclamen persicum* Hybr.

nimmt jedoch keine solchen Ausmaße an, wie z. B. bei den Wildformen von *Cyclamen*, bei *Linaria*, *Tropaeolum* und *Taraxacum*. Dies erklärt

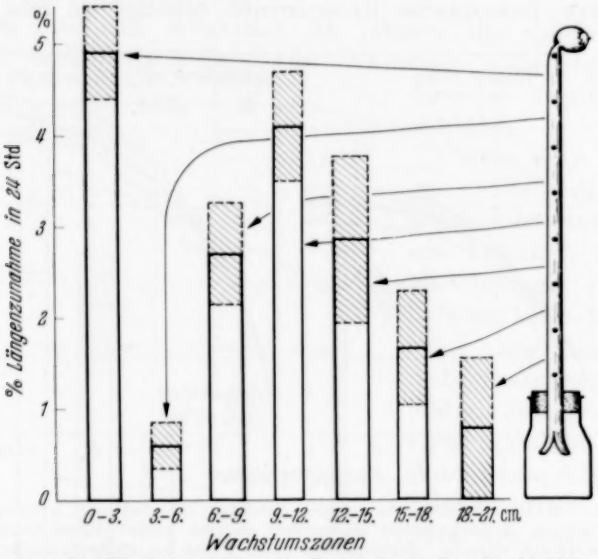


Abb. 5. Verteilung des Wachstums über die Gesamtlänge der Fruchtstiele. Schraffierte Felder: Einfacher mittlerer Fehler

vielleicht, daß die Fruchtstiele von *Cyclamen persicum* Hybr. keine spiralige Einkrümmung zeigen wie die Wildformen, sondern nur einen Krümmungsbogen von maximal 180° beschreiben.

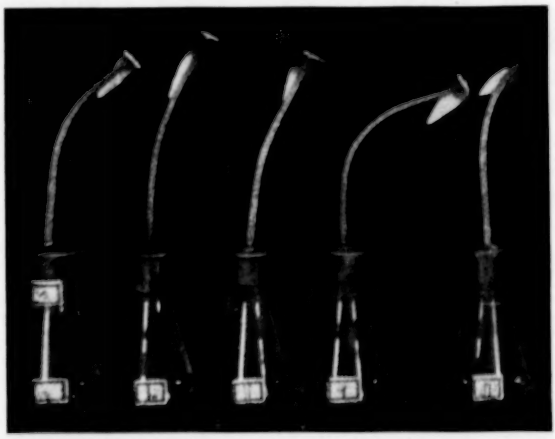


Abb. 6. Positiv phototropische Krümmung junger Blütenstiele, nach 10stündiger, lateraler Belichtung mit 5000 Lux. Pfeil: Lichtrichtung

Bei einer Reihe von Stielen fällt zwar die Korolle ab, aber die weiteren postfloralen Erscheinungen bleiben aus. Sie sind auch gegen einen Lichtreiz unempfindlich und beginnen nach einigen Tagen zu faulen.

2. Das phototropische Verhalten von jungen Stielen und von Fruchtstielen

a) Junge Stiele. Aus einigen orientierenden Vorversuchen ergab sich, daß das phototropische Verhalten abgeschnittener Blütenstiele, dem von Blütenstielen an der Pflanze fast gleich ist und sich nur gelegentlich durch das Ausmaß der Krümmungen unterscheidet. Dies kann auf das reduzierte Wachstum der abgeschnittenen Blütenstiele zurückgeführt werden. Die jungen Stiele zeigen bei lateraler Belichtung mit 5000 Lux eine positive Lichtkrümmung, die innerhalb von 5 Std einen durchschnittlichen Wert von 15° erreicht. Bei 24stündiger Belichtung steigt die Reaktion bis auf 44° an (Abb. 7a).

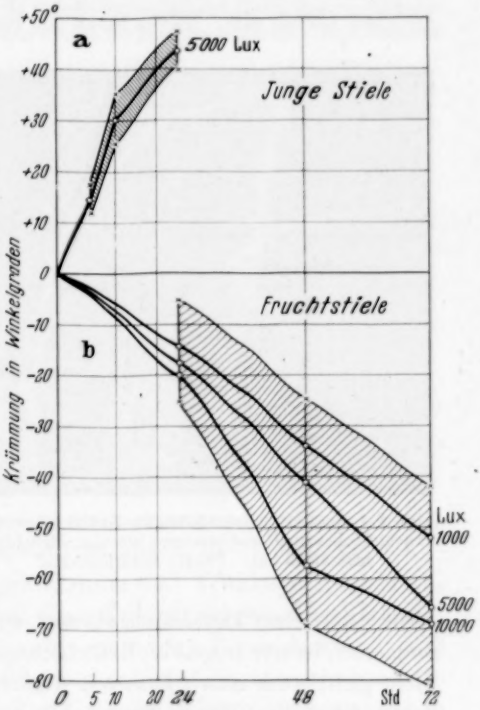


Abb. 7a u. b. a Positiv phototrope Reaktion von jungen Blütenstielen auf laterale Belichtung mit 5000 Lux. b Negative phototrope Reaktion von Fruchtstielen auf laterale Belichtung mit 1000, 5000 bzw. 10000 Lux. Schraffiertes Feld: Band des einfachen mittleren Fehlers. Abszisse: Beobachtungsdauer

Einige Stiele sind nach dieser Zeit jedoch bereits so stark gekrümmt, daß das Licht jetzt auf die frühere Schattenflanke fällt. Die Versuche wurden deshalb zu diesem Zeitpunkt unterbrochen. Die Krümmungen liegen meist im Bereich der Zone des maximalen Wachstums. Gelegentlich erstrecken sie sich aber auch nach der Stielbasis. In diesem Falle kann man jedoch kaum eine echte Reizleitung annehmen, wie dies etwa beim *Avena*-Typus der Fall ist (Abb. 6). Dagegen sprechen unter anderem die scharf am apikalen Ende lokalisierten Krümmungen bei manchen Objekten, die während des Versuches aufblühen. Die Ursache dafür ist allein in der Verteilung des Wachstums zu suchen.

b) Fruchtstiele. Bei vielen älteren Stielen liegt zwischen dem Abfall der Korolle und dem Einsetzen des negativen Phototropismus eine Indifferenzphase von mehreren (bis zu etwa 12) Stunden Dauer. Da die Stiele zwischen dem Abfall der Korolle und der Belichtung nur einige Stunden im Dunkel standen, ist in der Reaktion noch ein Teil der Indifferenzphase mitenthalten. Dies erklärt auch die relativ geringe Krümmung innerhalb der ersten 24 Std (Abb. 7b). Beläßt man aber die Stiele die ganze Indifferenzphase im Dunkel, um dort das Einsetzen des

postfloralen Wachstums abzuwarten, dann ist nach diesem Zeitraum ein Teil der Stiele bereits so stark aphototrop gekrümmt, daß sie für einen Lichtversuch kaum mehr verwendet werden können. Fruchtstiele sind nach 24stündiger einseitiger lateraler Belichtung mit 5000 Lux 17° negativ gekrümmt und erreichen in den nächsten 48 Std durchschnittlich 65°. Wie aus Abb. 7b hervorgeht, tritt bei schwächeren und stärkeren Lichtintensitäten ebenfalls eine negative Krümmung von annähernd gleicher Größe ein. Wenn man die Reaktionskurven von jungen Stielen und von Fruchtstielen betrachtet, kann man für die Größe der Krümmung in einem bestimmten Zeitraum keinen quantitativen Vergleich anstellen. Die Ursache liegt darin, daß bei Beginn der Belichtung junge Stiele bereits reaktionsfähig, Fruchtstiele dagegen der anfänglichen Indifferenzphase unterworfen sind. Deshalb setzt bei jungen Stielen die positive Krümmung viel früher ein als bei Fruchtstielen die negative. Es kann also mit Sicherheit nur ausgesagt werden, daß Fruchtstiele nach einer Belichtungsdauer, auf die junge Stiele deutlich positiv reagieren, immer negative Krümmungen aufweisen (Abb. 7b). Diese Tatsache geht auch aus genaueren Untersuchungen von OEHLKERS (1922) gerade über diese Frage hervor. Die negativen Krümmungen liegen meist im mittleren Abschnitt der Stiele. Sie lassen sich jedoch gelegentlich auch in der Nähe des apikalen bzw. des basalen Endes feststellen (Abb. 8).

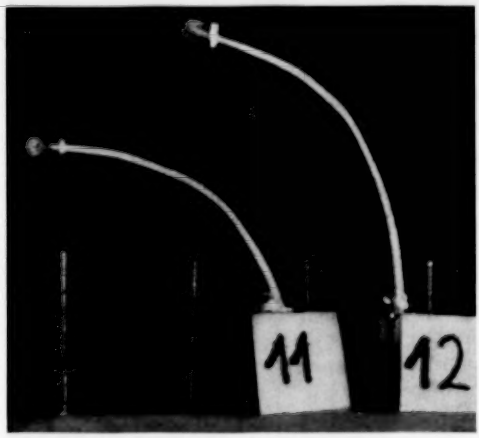


Abb. 8. Negativ phototropische Krümmung von Fruchtstielen nach 48stündiger, lateraler Belichtung mit 5000 Lux. Pfeil: Lichtrichtung

Es konnten auch, wie bei *Tropaeolum maius*, Krümmungen beobachtet werden, die von einer ungekrümmten Region getrennt waren.

3. Wuchsstoffgehalt der Blütenstiele während verschiedener Entwicklungsstadien

Wie die Ergebnisse der Wachstumsmessungen an Blütenstielen und Fruchtstielen vermuten lassen, wird das prä- und postflorale Wachstum durch Wuchsstoff, der von der Blütenknospe bzw. von der sich entwickelnden Frucht abgegeben wird, geregelt. Daher wurde eine genauere Untersuchung des Wuchsstoffgehaltes der Blüten- und Fruchtstiele vorgenommen. Um zunächst einen qualitativen Überblick über den Wuchs-

stoffgehalt der Stiele in den einzelnen Entwicklungsphasen zu erhalten, wurde die Agar-Würfel-Abfangmethode mit anschließender Prüfung der aufgenommenen Wuchsstoffmenge durch den *Avena*-Krümmungstest gewählt.

Es wurde jeweils aus der Hauptwachstumszone der Stiele ein 10 mm langer Cylinder geschnitten, dem an die untere Schnittfläche ein 1,5×3×3 mm großes Agarplättchen mittels 10%iger Gelatine angeklebt wurde. Diese Gewebecylinder wurden mit Gelatine an einem Ständer schwebend befestigt, so daß sie durch ihr verhältnismäßig schweres Gewicht die Agarplättchen nicht zerdrücken konnten. Der Ständer bestand aus einer Querleiste aus Ebonit mit mehreren runden Ausstanzungen, die von Aluminiumfüßen getragen wurde (Abb. 9). Nach ihrer Beschikkung kam diese Vorrichtung in eine feuchte Kammer, um ein Austrocknen der Agarwürfel zu verhindern. Nach 3 Std wurden die Agarwürfel vom Gewebe getrennt und auf inzwischen vorbereitete *Avena*-Koleoptilen einseitig aufgesetzt. Der Test wurde nach der üblichen Methode im Dunkeln durchgeführt (vgl. CHROMETZKA 1955). Das Ausmessen der Krümmungen wurde nach 1/4stündiger Expositionszeit mittels der von SÖDING (1952) angegebenen Methode vorgenommen. Von jedem Entwicklungsstadium wurden 10—12 Stiele geprüft.

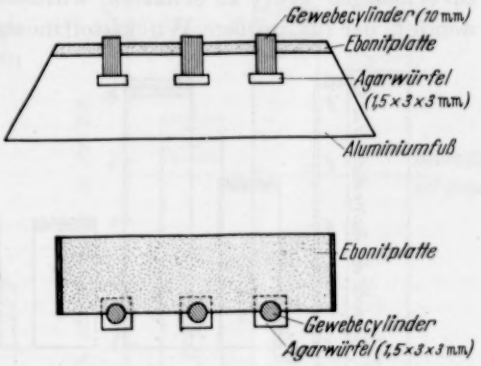


Abb. 9a u. b. Halter zur Befestigung der Gewebecylinder. a Querschnitt, b Aufsicht

Aus jungen Stielen mit Knospen konnte eine Wuchsstoffmenge abgefangen werden, die im *Avena*-Test eine Krümmung von durchschnittlich 14° verursachte. Diese Krümmung entspricht ihrem Ausmaß nach etwa der, die mit 10^{-7} molarer synthetischer IES-Lösung vorbehandelte Agarwürfel hervorrufen. Stiele vollentwickelter Blüten hingegen gaben keinen Wuchsstoff an den Agar ab (vgl. SÖDING 1938). Etwa 1—2 Tage nach dem Abblühen ließ sich jedoch in der Regel in den Fruchtstielen ein ansehnlicher erneuter Anstieg des Wuchsstoffspiegels beobachten.

Aus Stielen, die zwar die Korolle abgeworfen hatten, aber nicht die sonstigen postfloralen Erscheinungen zeigten, konnte kein Wuchsstoff abgefangen werden. Diese Tatsache spricht dafür, daß von den sich entwickelnden Samenanlagen Wuchsstoff in den Stiel abgegeben wird.

In den Stielen befruchteter Blüten kann 6—7 Tage nach dem Abfall der Korolle noch Wuchsstoff nachgewiesen werden. Bei der weiteren Entwicklung der Frucht sinkt der Wuchsstoffgehalt im Stiel plötzlich ab. Die mit dem von Blütenstielen abgefangenem Wuchsstoff im *Avena*-Test erzielten Krümmungen sind, wie auch SÖDING (1936) am gleichen Objekt gezeigt hat, im Herbst und Frühjahr viel größer als im Winter.

Dies dürfte jedoch hauptsächlich auf den als Testpflanze verwendeten Hafer zurückzuführen sein, dessen Auxinempfindlichkeit jahresperiodisch variiert. Daß die Ursache für die schwache Winterreaktion beim verwendeten Versuchsobjekt liegt, ist ziemlich unwahrscheinlich, da die Hauptvegetationsperiode der Gewächshaus-*Cyclamen* gerade in die Wintermonate fällt und auch das Längenwachstum der Blütenstiele dann im Vergleich zum Herbst nicht schwächer ist.

Um für den oben erwähnten Wuchsstoffanstieg in Fruchtstielen einen zuverlässigen Wert zu erhalten, wurde nunmehr der Cylindertest verwendet, der für größere Wuchsstoffmengen geeigneter ist.

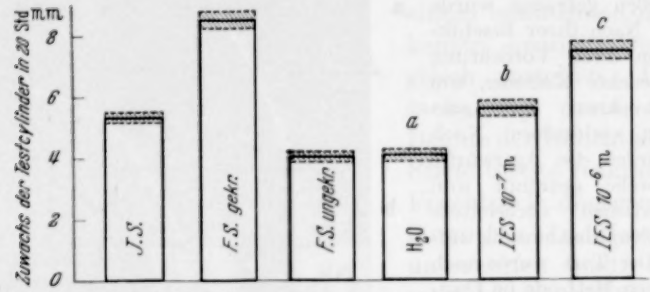


Abb. 10. Wuchsstoffgehalt der Extrakte von jungen Stielen und von Fruchtstielen, ermittelt durch den *Avena*-Cylindertest. Schraffierte Felder: Einfacher mittlerer Fehler. *J.S.* Extrakt junger Stiele; *F.S.gekr.* Extrakt von Fruchtstielen, die aphototrop gekrümmt waren. *F.S.ungekr.* Extrakt von Fruchtstielen, die nicht aphototrop gekrümmt waren. *a*—*c* Kontrollen in H_2O, in 10^{-7} m IES und in 10^{-6} m IES

Zu diesem Zweck wurden 10 mm lange Gewebecylinder aus der jeweiligen Hauptwachstumszone geschnitten. 1 g dieses Materials wurde mit 10 ml absolutem Äthanol bei 0°C (Eisbad) im Mörser zerrieben. Der Gewebebrei wurde durch eine Sinternutsche filtiert und mit 20 ml Äthanol nachgewaschen. Dieser Rohextrakt wurde sodann zur Trockne gebracht und der Rückstand in 10 ml 10^{-2} mol Phosphat-Pufferlösung von p_H 5,3 aufgenommen. Anschließend wurde der Wuchsstoffgehalt des Extrakts mit zehn 10 mm langen *Avena*-Koleoptilcylindern getestet. Die Koleoptilcylinder wurden 3 mm unterhalb der Spitze herausgeschnitten. Als Kontrollen dienten die reinen Pufferlösungen und entsprechend gepufferte IES-Lösungen. Die Versuchslösungen wirkten 20 Std auf die Objekte ein. Danach wurde der Zuwachs mit Hilfe einer starken Lupe gemessen. Sämtliche Operationen wurden im stark gedämpften Tageslicht ausgeführt (vgl. auch BENTLEY 1953 und BUSSE 1956).

Auf Grund der erhaltenen Ergebnisse zeigte sich, daß der Wuchsstoffspiegel von Fruchtstielen höher liegt als der von Blütenstielen (Abb. 10).

Der Zuwachs der *Avena*-Cylinder im Extrakt von jungen Stielen betrug $5{,}32 \pm 0{,}17$ mm, der im Extrakt von Fruchtstielen $8{,}55 \pm 0{,}20$ mm, er war also um etwa 60 % größer ($\sigma > 3$).

In Gewebeextrakten von Fruchtstielen, die, trotzdem sie ihre Korolle abgeworfen hatten, nicht die sonstigen postfloralen Erscheinungen zeigten, war das Wachstum der Testpflanzen gleich dem der Wasserkontrollen. Bei solchen Stielen bleibt also der erneute Wuchsstoffanstieg aus.

4. Phototropisches Verhalten junger Stiele mit künstlich erhöhtem Wuchsstoffspiegel[1]

Die bereits erwähnte Erhöhung des Wuchsstoffspiegels in den Fruchtstielen könnte zur Folge haben, daß damit eine für den Stiel supraoptimale Wuchsstoffkonzentration im Gewebe erreicht wäre. Der postflorale negative Phototropismus könnte dann etwa durch folgenden Mechanismus ausgelöst werden: Eine Photooxydation des Wuchsstoffes in der belichteten Flanke würde die vorhandene Konzentration dann wieder so weit verringern, daß sie in den optimalen Bereich der Auxinwirkungskurve rücken

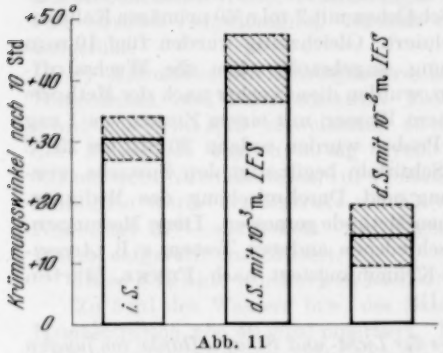


Abb. 11

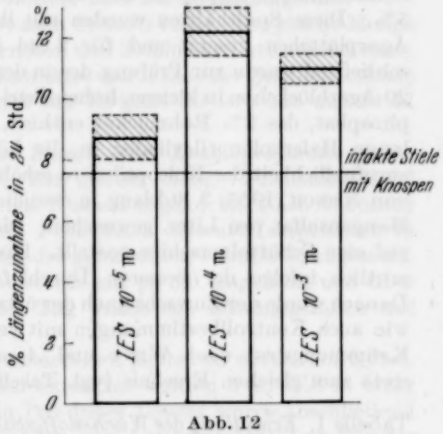


Abb. 12

Abb. 11. Phototrope Reaktion junger, dekapitierter Stiele bei apikaler Zufuhr von supraoptimalen IES-Konzentrationen und intakter Kontrollen. Laterale Belichtung mit 5000 Lux × 10 Std. Schraffiertes Feld: Einfacher mittlerer Fehler. *i.S.* intakte Stiele; *d.S.* dekapitierte Stiele

Abb. 12. Abhängigkeit des Längenwachstums dekapitierter, junger Blütenstiele von der Konzentration der apikal zugeführten IES-Lösung. Schraffierte Felder: Einfacher mittlerer Fehler

würde und das Wachstum der Lichtflanke über das der Schattenflanke steigen ließe. Zur Prüfung dieser Möglichkeit wurde jungen, dekapitierten Stielen mittels Glasröhrchen apikal eine supraoptimale IES-Konzentration (10^{-3} bzw. 10^{-2} molar) zugeführt, um den endogenen Wuchsstoffspiegel künstlich zu erhöhen. Erstaunlicherweise reagierten derart behandelte Stiele stark positiv (s. Abb. 11).

Zum Vergleich sei erwähnt, daß eine Konzentration von 10^{-3} m das Längenwachstum gegenüber der optimalen Konzentration von 10^{-4} m bereits hemmt (Abb. 12).

5. Wuchsstoffgehalt der Licht- und Schattenflanke von jungen Stielen und von Fruchtstielen

Um den Gedanken weiter zu verfolgen, ob die inverse Reaktionsrichtung von jungen Stielen und von Fruchtstielen auf eine entsprechende

[1] Bei dieser Versuchsreihe wurde ein 83%iges Kaliumsalz der β-Indolylessigsäure von der Firma Bayer, Leverkusen, verwendet.

Asymmetrie der Wuchsstoffverteilung zurückzuführen sei, sollten nunmehr die tatsächlichen Wuchsstoffverhältnisse in der Licht- und Schattenflanke von positiv und negativ reagierenden Stielen ermittelt werden.

Zu diesem Zweck wurden Stiele mit 5000 Lux Dauerlicht einseitig bestrahlt, bis eine deutliche Lichtkrümmungsreaktion beobachtet werden konnte, d.h. bei jungen Stielen 17 Std, bei Fruchtstielen 40 Std. Dann wurden Licht- und Schattenflanke voneinander getrennt und auf die darin enthaltenen Wuchsstoffmengen untersucht. Dazu wurden die Krümmungszonen in 5 mm lange Cylinder geteilt und diese mit einer Rasierklinge so gewichtsgleich wie möglich in Licht- und Schattenflanke gespalten. Der durchschnittliche Gewichtsunterschied betrug etwa 5%. Diese Spalthälften wurden mit ihrer Basalfläche auf $1{,}5 \times 3 \times 3$ mm große Agarplättchen gesetzt und für 2 Std in eine feuchte Kammer gebracht. Anschließend wurde zur Prüfung der in den Agar abgegebenen Wuchsstoffmengen je 20 Agarblöckchen in kleinen, hohen Petri-Schälchen mit 2 ml n/60 primären Kaliumphosphat, das 2% Rohrzucker enthielt, eluiert. Gleichzeitig wurden fünf 10 mm lange Haferkoleoptilcylinder in die Lösung eingebracht. Um die Wuchsstoffempfindlichkeit der Koleoptilen zu erhöhen, wurden diese vorher nach der Methode von NITSCH (1955) 3 Std lang in destilliertem Wasser, mit einem Zusatz von 1 mg Mangansulfat pro Liter, gewaschen. Die Proben wurden sodann 20 Std bei 25°C auf eine Schüttelmaschine gestellt. Das Schütteln begünstigt den Zuwachs, vermutlich infolge der besseren Durchlüftung und Durchmischung des Mediums. Danach wurde der Zuwachs nach der üblichen Methode gemessen. Diese Messungen, wie auch Kontrollbestimmungen mit verschiedenen anderen Testen, z.B. *Avena*-Krümmungstest nach WENT und *Avena*-Krümmungstest nach FUNKE, führten stets zum gleichen Ergebnis (vgl. Tabelle 1).

Tabelle 1. *Ermittlung des Wuchsstoffgehaltes der Licht- und Schattenflanke von jungen Stielen und von Fruchtstielen, die 17 Std bzw. 40 Std mit 5000 Lux einseitig belichtet wurden.* Dauer des *Avena*-Cylindertests: 20 Std

Entwicklungsstadium der Stiele	Zuwachs der Testpflanzen in mm		Kontrollen in	
	Lichtflanke	Schattenflanke	IES (5×10^{-7} m)	Wasser
Junge Stiele mit Knospen . .	$2{,}70 \pm 0{,}09$	$2{,}67 \pm 0{,}11$	$2{,}57 \pm 0{,}21$	$1{,}26 \pm 0{,}07$
Fruchtstiele	$2{,}27 \pm 0{,}10$	$2{,}00 \pm 0{,}08$	$2{,}57 \pm 0{,}21$	$1{,}26 \pm 0{,}07$

Bei jungen Stielen konnte niemals ein eindeutiger Unterschied im Wuchsstoffgehalt der Licht- und Schattenflanke festgestellt werden. Bei Fruchtstielen ergab sich ein geringer Unterschied im Wuchsstoffgehalt zugunsten der Lichtflanke, der sich aber auf Grund der bisherigen Ergebnisse statistisch noch nicht hinreichend sichern ließ. Sollte sich in späteren Versuchen dieser Unterschied als wirklich signifikant erweisen, könnte an eine eventuelle Aktivierung oder Neubildung des Wuchsstoffes durch das Licht gedacht werden.

6. Versuch eines Nachweises von Riboflavin oder eines anderen Sensibilisators im Gewebe

Nach den Ergebnissen der vorhergehenden Versuche kann bei jungen Stielen von *Cyclamen persicum* kaum mit einer Photolyse von Wuchs-

stoff gerechnet werden. Um diese Frage besser entscheiden zu können, wurde mittels verschiedener Methoden zunächst ein Nachweis von Riboflavin im Blütenstielgewebe versucht, das bekanntlich in vitro die Photolyse der IES sensibilisiert (GALSTON 1949; REINERT 1952; BRAUNER 1953; L. und M. BRAUNER 1954).

Die für diese Versuche nötigen Pflanzenextrakte wurden nach folgenden Verfahren hergestellt;

a) Extraktion mit Wasser. 10 g Gewebe wurde mit 10 ml destilliertem Wasser homogenisiert. Das Homogenisat wurde filtriert und auf 20 ml aufgefüllt.

b) Extraktion mit Salzsäure (modifiziert nach STRONG 1955). Die gleiche Menge Gewebe wurde mit 10 ml n/10 Salzsäure verrieben und 30 min bei 1 atü autoklaviert. Die anschließende Weiterverarbeitung des Extraktes wurde nach der Originalmethode von STRONG vorgenommen. Danach wurde der Extrakt filtriert und auf 20 ml aufgefüllt.

c) Extraktion mit Schwefelsäure unter Zusatz eines Enzympräparates (nach BELOSERSKI und PROSKURJAKOW 1956). Die gleiche Menge Pflanzenmaterial wurde mit 75 ml n/10 Schwefelsäure 45 min im Wasserbad gekocht. Nach Abkühlen der Flüssigkeit wurden 30 mg Mycel von *Penicillium notatum*, suspendiert in 0,3 molarem Natriumacetat, zur Freisetzung des gebundenen Riboflavin zugesetzt. Daraufhin wurde der Extrakt mit Natriumacetat auf p_H 5,0 eingestellt und über Nacht bei 37°C entwickelt. Am folgenden Tag wurde das Lösungsgemisch auf 100 ml aufgefüllt und filtriert.

Diese Extrakte wurden nun nach 2 verschiedenen Methoden weiterverarbeitet.

Zu 5 ml des Wassers bzw. des Salzsäureextraktes wurden 5 ml IES in einer Konzentration von 40 γ/ml pipettiert. Ein Teil dieser Lösung wurde anschließend in flachen Petri-Schalen (Schichtdicke der Lösungen 1 cm) mit 5000 Lux 30 oder 60 min lang von oben belichtet (vgl. BRAUNER 1953). Als Kontrolle dienten Extrakte, die außer der IES noch einen Zusatz von 5 γ/ml Riboflavin enthielten, sowie eine IES-Lösung mit Riboflavinzusatz. Nach Beendigung der Belichtung wurden die noch vorhandenen Mengen an IES mit dem Salkowski-Reagens colorimetrisch bestimmt. Zur Einstellung des Nullwertes diente der mit dem Reagens versetzte Extrakt, um die Eigenextinktion des Reagens und des Anthozyans zu kompensieren.

Tabelle 2. *Belichtung von Stielextrakten mit Zusatz von IES bzw. IES und Riboflavin* (Belichtung: 5000 Lux × 30 min bzw. 60 min)

Testlösungen	Extraktionsmethode	Belichtungsdauer in min	Extinktion	
			Lichtprobe	Dunkelprobe
Extrakt von jungen Stielen + IES (20 γ/ml)[1]	Wasserextraktion	60	0,201	0,181
	Salzsäureextraktion	30	0,230	0,206
Extrakt von Fruchtstielen + IES (20 γ/ml)	Wasserextraktion	60	0,223	0,206
	Salzsäureextraktion	30	0,205	0,205
Extrakt von jungen Stielen + IES (20 γ/ml) + Riboflavin (5 γ/ml)	Wasserextraktion	60	0,026	0,215
IES (20 γ/ml) + Riboflavin (5 γ/ml)	—	30	0,040	0,235

[1] Die Zahlenwerte geben die IES- bzw. Riboflavin-Konzentration der gesamten Lösung an.

Bei diesen Versuchen trat bei Belichtung eine Zerstörung der IES nur dann ein, wenn die Extrakte außer dem Wuchsstoff noch künstlich zugesetztes Riboflavin enthielten. Die merkwürdige Erscheinung, daß die Extinktionswerte belichteter Proben ohne Riboflavinzusatz meist etwas höher lagen als die Werte der Dunkelkontrollen, kann kaum durch eine Oxydasewirkung in den Dunkelkontrollen zustande kommen, da sich Proben, die mit Säure gekocht wurden, genauso verhielten.

Der nach Methode c gewonnene Extrakt wurde papierchromatographisch geprüft. Zu diesem Zweck wurden auf einen Filterpapierbogen (Schleicher und Schüll 2043b) mit einer Mikropipette 0,10 ml Extrakt und daneben als Vergleichssubstanz 0,01 γ Riboflavin in Lösung aufgetragen. Das Lösungsmittel für das Chromatogramm bestand aus 4 Teilen Äthanol und 1 Teil Wasser. Nach 16stündiger Laufzeit wurde das Chromatogramm herausgenommen, getrocknet und anschließend mit einer UV-Lampe auf die Fluorescenz der Substanzen untersucht.

Es zeigte sich eine schwache Fluorescenz oberhalb der Startlinie des Extraktes, die jedoch nicht mit der Fluorescenz des mitchromatographierten Riboflavins gleichgesetzt werden kann, da sie sich von dieser in Farbe und Lage unterschied.

7. Saugkraft der Licht- und Schattenflanke von jungen Stielen und von Fruchtstielen

Da sich aus den bisherigen Versuchen, bei denen stets mit einer Lichtwirkung auf den Wuchsstoff gerechnet wurde, keine einwandfreien Erklärungsmöglichkeiten für den Phototropismus der *Cyclamen*-Blütenstiele ergaben, wurde nun nach einem andersartigen Mechanismus gesucht. In früheren Arbeiten (GIUS 1907; KERSTAN 1908; TRÖNDLE 1910) wird gelegentlich an eine Veränderung des osmotischen Systems der Pflanze durch Licht gedacht. Die Lichtwirkung könnte eine Erhöhung bzw. Erniedrigung der Permeabilität, der Saugkraft und damit des Turgors verursachen. Daß solche Vorstellungen berechtigt sind, zeigen unter anderen L. BRAUNER und M. BRAUNER 1936, 1940, 1947, die lichtbedingte Permeabilitäts- und Turgorreaktionen feststellen konnten. Im folgenden wurde in Anlehnung an diese Versuche von der großen Anzahl der möglichen Wirkungen des Lichts auf das osmotische System der Pflanze vorerst nur die Beeinflussung der Saugkraft und der Wasserpermeabilität untersucht. Auf Grund entsprechender Versuche über die Primäreffekte der geotropischen Induktion war nämlich daran zu denken, daß der phototropische Reiz zu vergleichbaren osmotischen Veränderungen führen könnte (vgl. WARNER 1928; BEYER 1932; METZNER 1934). Um diese Möglichkeit am vorliegenden Objekt näher zu prüfen, wurde der Einfluß einseitiger Belichtung auf die Saugkraft von jungen Stielen und von Fruchtstielen gemessen. Eine Anzahl von Stielen wurde 17 Std (junge Stiele) bzw. 40 Std (Fruchtstiele) einseitig mit 5000 Lux belichtet, andere die gleiche Zeit im Dunkel belassen.

Daraufhin wurde die Krümmungszone bzw. eine entsprechende Zone der Dunkelpflanzen in 1 cm lange Stücke geteilt, die im ersten Fall in Licht- und Schattenflanke, im zweiten Fall in 2 identische Hälften gespalten wurden. Mehrere solcher Spalthälften, die ein Gesamtgewicht von durchschnittlich 500 mg hatten, wurden auf einer Analysenwaage gewogen und sodann in eine Konzentrationsreihe von Mannit sowie in reines Wasser eingebracht. Es wurde stets darauf geachtet, daß die Licht- und Schattenflanke bzw. die beiden Flanken der Dunkelkontrollen des gleichen Gewebecylinders verglichen wurden. Nach 2 Std wurde das Gewebe aus den Lösungen genommen, mit Zellstoffwatte sorgfältig abgetrocknet und nochmals gewogen. Aus den Gewichtsänderungen in den einzelnen Stufen der Konzentrationsreihe ließ sich dann die Saugkraft der Gewebe ermitteln.

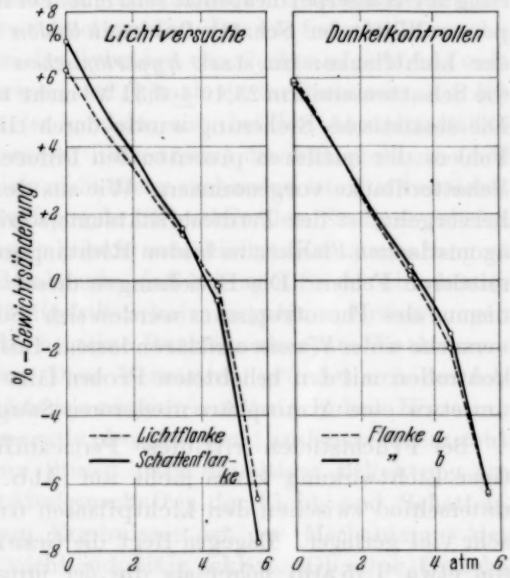


Abb. 13. Gravimetrische Bestimmung der Saugkraft von Licht- und Schattenhälften einseitig belichteter, junger Stiele (5000 Lux × 17 Std). Zum Vergleich die Saugkraftskurven der Längshälften gleich alter Dunkelkontrollen

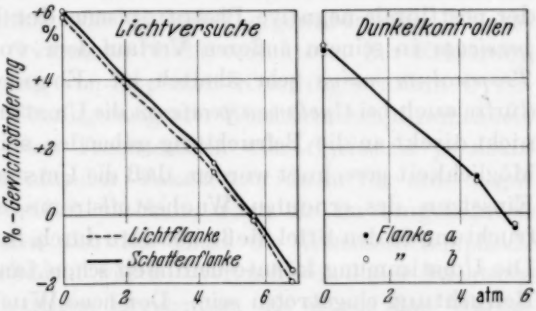


Abb. 14. Gravimetrische Bestimmung der Saugkraft von Licht- und Schattenhälften einseitig belichteter Fruchtstiele (5000 Lux × 40 Std). Zum Vergleich die Saugkraftskurve der Längshälften gleich alter Dunkelkontrollen

Die Abb. 13 und 14 zeigen das Ergebnis. Die dargestellten Diagramme lassen zunächst erkennen, daß die Licht- und Schattenflanke junger Stiele in ihrer Saugkraft keine signifikanten Unterschiede aufweisen (Abb. 13). Vergleicht man aber die Gewichtszunahme von Licht- und Schattenflanke in reinem Wasser, so läßt sich feststellen, daß die Schattenflanke in 2 Std um $14{,}0 \pm 4{,}19\%$ [1]

[1] Berechnet aus den Einzelquotienten.

mehr Wasser aufnimmt als die Lichtflanke. Daraus ist zu schließen, daß der eigentlich entscheidende Faktor bei der Lichtreaktion eine Veränderung der Wasserpermeabilität sein muß. Ferner ergab sich, daß die Wasserpermeabilität der Schattenflanke in *beiden* Richtungen höher ist als die der Lichtflanke: im stark *hypertonischen Medium* (5,65 atm) verliert die Schattenseite um $23{,}10 \pm 5{,}31\,\%$[1] mehr an Gewicht als die Lichtseite. Die statistische Sicherung wurde durch die Errechnung des mittleren Fehlers der mittleren prozentualen Differenz zwischen der Licht- und Schattenflanke vorgenommen. Wie aus den oben angegebenen Werten hervorgeht, ist der Permeabilitätsunterschied zwischen den beiden antagonistischen Flanken in beiden Richtungen größer als dessen dreifacher mittlerer Fehler. Die Beziehungen dieser Erscheinungen zum Mechanismus des Phototropismus werden sich jedoch erst durch Belichtungsversuche unter Wasser aufklären lassen. Bei einem Vergleich der Dunkelkontrollen mit den belichteten Proben fällt auf, daß sie insgesamt einen um etwa eine Atmosphäre niedereren Saugkraftswert besitzen.

Bei Fruchtstielen tritt diese Permeabilitätsverschiebung bei einseitiger Lichtwirkung kaum mehr auf (Abb. 14). Auch der Saugkraftsunterschied zwischen den Lichtpflanzen und den Dunkelkontrollen ist sehr viel geringer. Dagegen liegt die Gesamtsaugkraft der Fruchtstiele um etwa 1,75 atm höher als die der jungen Blütenstiele (Werte der Dunkelkontrollen).

D. Diskussion

Eine Übersicht über die bisherigen Ergebnisse läßt erkennen, daß der postflorale negative Phototropismus der Fruchtstiele von *Cyclamen persicum* in seinem äußeren Verlauf dem von *Linaria cymbalaria* und *Tropaeolum maius* sehr ähnlich ist. Ebenso wie bei diesen Objekten dürfte auch bei *Cyclamen persicum* die Umstimmung des Phototropismus nicht direkt an die Befruchtung gebunden sein. Auch hier muß mit der Möglichkeit gerechnet werden, daß die Umstimmung nicht erst mit dem Einsetzen des erneuten Wuchsstoffstroms erfolgt, der nach der Befruchtung in den Stiel fließt, sondern durch ihn lediglich erkennbar wird. Die Umstimmung könnte demnach schon lange vor dem Zeitpunkt der Befruchtung eingetreten sein. Der neue Wuchsstoffstrom wird dagegen durch die Entwicklung der Embryonen in den Samenanlagen ausgelöst. Dies ist daran zu erkennen, daß die Stiele befruchteter Blüten zwischen dem Abfall der Korolle und dem Einsetzen der phototropischen Krümmung einer Indifferenzphase unterworfen sind und viele Stiele nach dem Abfall der Korolle keine Krümmung zeigen, wenn der Fruchtknoten nicht anzuschwellen beginnt. Tatsächlich ließ sich auch direkt nachweisen, daß in solchen Stielen der Wuchsstoffspiegel auf Null abgesunken

[1] Berechnet aus den Einzelquotienten.

ist. In den letzten Versuchen wurden auch Stiele beobachtet, deren Fruchtknoten zwar anschwellen, an denen aber die sonstigen postfloralen Erscheinungen ausbleiben. Die Ursache dieses eigenartigen Verhaltens kann vorerst nur vermutet werden. Da, wie festgestellt wurde, die postfloralen Krümmungen der Hybriden von *Cyclamen persicum* weit schwächer als die der Wildformen sind, könnte es durchaus sein, daß bei stark überzüchteten Formen (es handelte sich bei den Ausnahmefällen meist um Pflanzen mit anomaler Blütenform) die Fähigkeit zu einer normalen postfloralen Reaktion nicht mehr vorhanden ist. Die beträchtliche Erhöhung des Wuchsstoffspiegels im postfloralen Stadium scheint mit der negativen Krümmung in keinem ursächlichen Zusammenhang zu stehen, da nachgewiesen werden konnte, daß in jungen Stielen eine künstliche Erhöhung des Wuchsstoffgehaltes keine negativen Krümmungen hervorruft. Dennoch kann die negative Reaktion als echte Wachstumskrümmung aufgefaßt werden. Diese Vermutung gründet sich auf folgende Beobachtungen: Fruchtstiele reagieren erst nach dem Einsetzen des postfloralen Wachstums negativ phototropisch; andererseits entsteht in ihnen nicht wie in jungen Stielen nach einseitiger Belichtung ein Unterschied der Permeabilitätseigenschaften der Licht- und Schattenflanke. Nach den bisherigen Ergebnissen ist der Mechanismus der negativen Krümmung noch nicht endgültig geklärt. Ob seine Ursache in der aufgefundenen geringen Wuchsstoffasymmetrie zugunsten der Lichtflanke zu suchen ist, wie dies Asana (1938) und Wilden (1939) für die negative Krümmung der *Avena*-Koleoptile fanden, ist noch fraglich. Als andere Möglichkeit wäre zu erwägen, ob das Licht die physiologische Empfindlichkeit des Gewebes gegenüber dem Wuchsstoff verändert, wie schon Overbeek (1933) vermutete. Zur Erklärung der positiven Lichtkrümmung von *Raphanus*-Keimlingen nahm Overbeek unter anderem eine Verringerung der Wuchsstoffempfindlichkeit der Lichtflanke an. Bei den Fruchtstielen von *Cyclamen persicum* könnte man einen entsprechenden Faktor nur dann für eine negative Krümmung verantwortlich machen, wenn sie im umgekehrten Sinne ablaufen würde, wenn also das Licht die Wuchsstoffempfindlichkeit der Lichtflanke erhöhen würde. Versuche in dieser Richtung zeigten jedoch keine eindeutigen Ergebnisse. Es wurde das Wachstum von Stielabschnitten der Licht- und Schattenflanke in optimalen IES-Konzentrationen untersucht. Nur bei einigen Proben zeigte sich eine geringe Wachstumsförderung der Lichtflanke gegenüber der Schattenflanke. Der Unterschied war jedoch in keinem Falle signifikant. Trotz dieses unbefriedigenden Ergebnisses muß aber zunächst noch mit diesem Faktor gerechnet werden, da die Unsicherheit der bisher angewandten Methode eine endgültige Entscheidung noch nicht rechtfertigt.

Der Mechanismus der positiven Reaktion junger Stiele scheint nach den bisher beschriebenen Versuchsergebnissen von dem normalen Reaktionsschema abzuweichen. Aus den letzten Versuchen dieser Arbeit läßt sich mit einiger Vorsicht schließen, daß die positive Krümmung der *Cyclamen*-Blütenstiele durch eine Variationsbewegung zustande kommt. An der Reaktion dürfte jedoch auch eine Wachstumskomponente beteiligt sein, eine Vermutung, für die die Tatsache spricht, daß die Krümmung gerade in den Hauptwachstumszonen auftritt. Eine primäre Rolle der Wachstumskomponente ist jedoch schon deshalb unwahrscheinlich, weil bei einseitiger Belichtung in der Licht- und Schattenflanke keine unterschiedlichen Wuchsstoffmengen aufgefunden werden konnten. Dies schließt sowohl einen Mechanismus aus, der auf einem Wuchsstoffquertransport von der Licht- zur Schattenflanke beruht, wie auch eine Photolyse der IES. Beide Mechanismen wurden in neueren Arbeiten von GORDON und EIB (1956), REISENER (1958) und v. GUTTENBERG (1959) auch bei der Haferkoleoptile in Frage gestellt. Zur Begründung der Annahme, daß bei *Cyclamen persicum* in vivo keine asymmetrische Wuchsstoffzerstörung bei einseitiger Belichtung stattfindet, kann auch der in vitro-Versuch angeführt werden, bei dem es nicht gelang, IES bei Zusatz von Gewebeextrakten durch Bestrahlung mit 5000 Lux zu inaktivieren. Möglicherweise fehlt dem System also der für eine Zerstörung der IES notwendige Photosensibilisator. Dafür spricht, daß bei Versuchen mit künstlichem Riboflavinzusatz eine Zerstörung der IES auftrat. Daraus ergibt sich ferner, daß die verwendete Lichtmenge für eine Photolyse ausgereicht hätte. Die Ergebnisse der zuletzt beschriebenen osmotischen Versuche könnte man folgendermaßen deuten:

Wenn bei einseitiger Belichtung die Schattenflanke in der Lage ist, osmotisch mehr Wasser aufzunehmen als die Lichtflanke, so müßte die entstehende asymmetrische Erhöhung des Turgors zu einer stärkeren Verlängerung der Schattenflanke führen. GIUS (1907) vermutet auf Grund seiner Beobachtungen eine höhere „Turgorkraft" der Schattenflanke bei einseitig belichteten Keimlingen. Neuere Untersuchungen (vgl. die Besprechung der einschlägigen Arbeiten bei BRAUNER 1956) zeigten jedoch, daß bei sochen Überlegungen der Permeabilitätsfaktor nicht vernachlässigt werden darf. Aus den Arbeiten von LEPESCHKIN (1930) und BRAUNER (1948) geht hervor, daß Licht die periphere Wasserpermeabilität der von ihnen untersuchten Gewebe erhöht.

Bei jungen Stielen von *Cyclamen persicum* scheint dagegen auf Grund der bisherigen Versuche die Wasserpermeabilität der Lichtflanke gegenüber der Schattenflanke verringert zu sein. Eine solche Permeabilitätsverringerung im Licht könnte tatsächlich auch bei gleichem primären Photoeffekt dann auftreten, wenn die verantwortlichen Grenzschichten

bereits von vorneherein sehr dicht sind, wenn also der limitierende Faktor beim Wasserdurchtritt nicht der elektrostatische Reibungswiderstand ist, sondern der verfügbare mechanische Porenquerschnitt. In diesem Falle könnte ein Ladungsverlust bei Belichtung den Diffusionsweg bereits so verengen, daß selbst der Durchtritt der kleinen Wassermoleküle erschwert würde. Zur Erklärung der beobachteten positiven Krümmung muß daher die Gesamtwasserbilanz der belichteten und der unbelichteten Flanke im wasserdurchströmten Organ betrachtet werden. Bei der Annahme, daß die Wasseraufnahmepermeabilität gegenüber dem Gefäßsystem wesentlich größer ist als die Abgabepermeabilität gegenüber dem Außenmedium, müßte im transpirierenden Organ der Turgor in der Schattenflanke selbst bei gleicher Saugkraft höher liegen als in der Lichtflanke. Da nun eine positive Krümmungsrichtung auf einen Turgorabfall in der Lichtflanke schließen läßt, muß sich die beobachtete Abnahme der Wasserpermeabilität der Lichtflanke vorwiegend in einer Behinderung der Wasseraufnahme ausgewirkt haben. Eine endgültige Entscheidung dieser Frage wird jedoch vom Ergebnis der bereits geplanten Untersuchung des Verhaltens der Stiele bei Belichtung unter Wasser abhängen.

Eine Analyse der geringen Zunahme der Saugkraft in der belichteten Stielhälfte steht noch aus. Als nächstliegende Ursache wäre wohl eine photosynthetische Anatonose zu erwägen.

Es ist geplant, die Untersuchung der vielen noch offen gebliebenen Fragen an genetisch reinerem Material fortzusetzen.

Zusammenfassung

1. Das Wachstum junger Blütenstiele von *Cyclamen persicum* ist fast über den ganzen Stiel verteilt. In der Region vom 1. bis zum 5. cm unterhalb des Blütenbodens befindet sich jedoch *eine* Hauptwachstumszone. Vom Stock isolierte Blütenstiele stellen nach etwa 4 Tagen ihr Wachstum ein und beginnen aufzublühen; bei dekapitierten Stielen kann die Dauer der Wachstumsphase durch apikale Zugabe von β-Indolylessigsäure etwas verlängert werden.

2. Auch das Wachstum der Fruchtstiele erstreckt sich fast über ihre ganze Länge, doch treten hier in der oberen Organhälfte *zwei* Hauptwachstumszonen auf.

3. Bei jungen Stielen wirkt die Knospe, bei Fruchtstielen der Fruchtknoten als Wuchsstoffquelle.

4. Junge Stiele mit Knospen reagieren auf einseitige Beleuchtung positiv phototropisch. Bei Bestrahlung mit 5000 Lux beträgt der durchschnittliche Krümmungswert nach 24 Std etwa 44°. Die Krümmungen liegen größtenteils in der Zone des maximalen Wachstums.

5. Fruchtstiele zeigen bei lateraler Belichtung mit der gleichen Intensität, die bei jungen Stielen eine positive Reaktion hervorruft, eine deutliche negative Krümmung. Diese ließ sich mit keiner der geprüften Lichtstärken in eine positive Reaktion umkehren.

6. Vom befruchteten Fruchtknoten fließt ein Wuchsstoffstrom in den Stiel. Der Wuchsstoffspiegel liegt hier höher als in jungen Stielen.

7. In dekapitierten jungen Stielen hat eine künstliche Erhöhung des Wuchsstoffspiegels durch apikale Versorgung mit supraoptimalen IES-Konzentrationen keine Umkehrung der normalen phototropischen Reaktion zur Folge. Für die Umstimmung des phototropischen Verhaltens der Fruchtstiele kann daher die Steigerung des endogenen Wuchsstoffgehaltes kaum maßgebend sein.

8. Der Mechanismus des positiven Phototropismus junger Stiele kann auch nicht auf eine asymmetrische Verteilung des Wuchsstoffes auf Licht- und Schattenflanke zurückgeführt werden.

9. Versetzt man wäßrige IES-Lösungen mit dem Homogenisat von jungen Stielen, so ruft eine Belichtung dieses Gemisches keine meßbare Zerstörung des Wuchsstoffes hervor. Der Gewebeextrakt scheint also keinen wirksamen Photosensibilisator zu enthalten. Ein Versuch, in ihm Riboflavin nachzuweisen, führte zu keinem Ergebnis.

10. Gravimetrische Messungen der Saugkraft von der Licht- und Schattenflanke einseitig belichteter Stiele ergeben keinen gesicherten Unterschied. Dagegen ist aus dem Verlauf der Bestimmungskurven eine deutliche Abnahme der Wasserpermeabilität in der belichteten Hälfte der jungen Stiele zu erkennen. In Fruchtstielen bleibt dieser Effekt aus.

11. Als primäre Ursache der positiven phototropischen Reaktion junger Stiele dürfte daher ein wuchsstoffunabhängiger Turgormechanismus in Frage kommen. Eine nachträgliche Fixierung der Krümmung durch eine Wachstumsreaktion ist jedoch denkbar.

12. Die negative Krümmung der Fruchtstiele ist eine echte Wachstumsbewegung, die möglicherweise durch eine Erhöhung des Wuchsstoffgehalts der Lichtflanke zustande kommt. Als andere Erklärung für die negative Krümmung ist eine durch die Bestrahlung verursachte Erhöhung der Wuchsstoffempfindlichkeit der Lichtflanke zu erwägen. Versuche zur Prüfung dieser Möglichkeit sind in Vorbereitung.

Literatur

ASANA, R. D.: On the relation between the distribution of auxin in the tip of *Avena*-Coleoptile and the first negative phototropic curvature. Ann. Botany **2**, 955—957 (1938).

BELOSERSKI, A. N., u. N. I. PROSKURJAKOW: Praktikum der Biochemie der Pflanzen. Berlin 1956.

Bentley, I. A., and S. Housley: Growth of *Avena* coleoptile sections in solutions of 3-indolyle acetic acid and 3-indolyle nitril. Physiol. Plantarum **66**, 480—484 (1953).

Beyer, A.: Untersuchungen zur Theorie der pflanzlichen Tropismen. Die Beziehung zwischen geotropischer Reizung und Wachstum bei Dikotylen. Planta (Berl.) **18**, 509—549 (1932).

Brauner, L.: Über den Einfluß des Lichtes auf die Wasserpermeabilität lebender Pflanzenzellen. Rev. Fac. Sci. Univ. Istanbul **1**, 50—55 (1935).

— Untersuchungen über die phototropischen Reaktionen des Primärblattgelenkes von *Phaseolus multiflorus* in weißem und in farbigem Licht. Rev. Fac. Sci. Univ. Istanbul B **13**, 210—267 (1948).

— Untersuchungen über die Photolyse des Heteroauxins. I. Z. Bot. **41**, 291—341 (1953).

— Die Beeinflussung des Stoffaustausches durch das Licht. In Handbuch der Pflanzenphysiologie, Bd. II, S. 381—397. Heidelberg 1956.

—, u. M. Brauner: Untersuchungen über den Einfluß des Lichtes auf die Zuckerpermeabilität lebender Pflanzengewebe. Rev. Fac. Sci. Univ. Istanbul **2**, 58—72 (1936).

— — Further studies of the influence of light upon the water intake and output of living plant cells. New Phytologist **39**, 104—128 (1940).

— — Untersuchungen über den Mechanismus der phototropischen Reaktion der Blattfiedern von *Robinia pseudacacia*. Rev. Fac. Sci. Univ. Istanbul B **12**, 35—79 (1947).

— — Untersuchungen über die Photolyse des Heteroauxins. II. Z. Bot. **42**, 83—124 (1954).

Bünning, E.: Entwicklungs- und Bewegungsphysiologie der Pflanze. Berlin 1953.

Busse, M.: Über die Wirkungen von β-Indolylessigsäure auf den Stoffwechsel von *Avena*-Koleoptilen. Planta (Berl.) **46**, 619—642 (1956).

Buy, H. G. du, u. E. Nuernbergk: Phototropismus und Wachstum der Pflanzen. I. Ergebn. Biol. **9**, 361—544 (1932).

— — Phototropismus und Wachstum der Pflanzen. II. Ergebn. Biol. **10**, 207—322 (1934).

— — Phototropismus und Wachstum der Pflanzen. III. Ergebn. Biol. **12**, 325—543 (1935).

Chrometzka, P.: Zur Kenntnis der Morphologie und des Wuchsstoffverhaltens der *Oenothera hybrida* mut. *helix*. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **87**, 267—297 (1955).

Darwin, Ch.: The power of movement in plants. London 1880.

Galston, A. W.: Riboflavin-sensitized photooxydation of indoleacetic acid and related compounds. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) **35**, 10—17 (1949).

— Phototropism of stems, roots, and coleoptiles. In Handbuch der Pflanzenphysiologie, Bd. 17, S. 492—529. 1958.

Gius, L.: Über den Einfluß submerser Kultur auf Heliotropismus und fixe Lichtlage. S.-B. Akad. Wiss. Wien, math.-nat. Kl. I **116**, 1593—1651 (1907).

Gordon, S. A., and M. Eib: Auxin transport in the phototropic response. Plant Physiol. **31**, Suppl., XIV (1956).

Guttenberg, v. H.: Über die Perception des phototropen Reizes. Planta (Berl.) **53**, 412—433 (1959).

Hofmeister, W.: Die Lehre von der Pflanzenzelle. Leipzig 1867.

Kerstan, K.: Über den Einfluß des geotropischen und heliotropischen Reizes auf den Turgordruck in den Geweben. Beitr. Biol. Pflanz. **9**, 163—210 (1908).

Kosanin, N.: Die Bewegungen der Blüten- und Fruchtstiele bei der Gattung *Cyclamen*. Bull. Inst. Bot. Univ. Beograd **1**, 260—286 (1930).

Leopold, A. C.: Auxin and plant growth. Berkeley 1955.

Lepeschkin, W. W.: Light and the permeability of protoplasma. Amer. J. Bot. **17**, 953—970 (1930).

Linser, H., u. O. Kiermayer: Methoden zur Bestimmung pflanzlicher Wuchsstoffe. Wien 1957.

Linskens, H. F.: Papierchromatographie in der Botanik. Berlin 1955.

Metzner, P.: Zur Kenntnis der Stoffwechseländerung bei geotropisch gereizten Keimpflanzen. Ber. dtsch. bot. Ges. **52**, 506—526 (1934).

Nitsch, J. P.: Methods for the investigation of natural auxin and growth inhibitors. In: The chemistry and mode of action of plant growth substances. London 1955.

Oehlkers, F.: Zur reizphysiologischen Analyse der postfloralen Krümmungen des Blütenstieles von *Tropaeolum maius*. Ber. dtsch. bot. Ges. **38**, 79—83 (1920).

— Zur reizphysiologischen Analyse der postfloralen Krümmungen des Blütenstiels von *Tropaeolum maius*. Ber. dtsch. bot. Ges. **39**, 20—25 (1921).

— Die postfloralen Krümmungen des Blütenstiels von *Tropaeolum maius* und das Problem der Umstimmung. Jb. wiss. Bot. **61**, 66—125 (1922).

Overbeek, J. van: Wuchsstoff, Lichtwachstumsreaktion und Phototropismus bei *Raphanus*. Rec. Trav. bot. néerl. **30**, 537—627 (1933).

Reinert, J.: Über die Bedeutung von Carotin und Riboflavin für die Lichtreizaufnahme bei Pflanzen. Naturwissenschaften **39**, 47 (1952).

Reisener, H. J.: Untersuchungen über den Phototropismus der Hafer-Koleoptile. Z. Bot. **46**, 474—504 (1958).

Schmitt, E. M.: Beziehungen zwischen der Befruchtung und den postfloralen Fruchtstielbewegungen bei *Digitalis*, *Althaea* und *Linaria*. Z. Bot. **14**, 625—674 (1922).

Söding, H.: Wirkt der Wuchsstoff artspezifisch? Jb. wiss. Bot. **82**, 534—554 (1936).

— Wuchsstoffbildung und Wuchsstoffverteilung in der Kompositenstaude *Heliopsis laevis* im Laufe einer Vegetationsperiode. Flora (Jena) **132**, 425—446 (1938).

— Wuchsstofflehre. Hannover 1952.

Strong, F. M.: Riboflavin, folic acid and biotin. In: Moderne Methoden der Pflanzen-Analyse, Bd. 4, S. 642—660. Berlin 1955.

Tröndle, A.: Der Einfluß des Lichtes auf die Plasmahaut. Jb. wiss. Bot. **48**, 171—282 (1910).

Vöchting, K.: Bewegungen der Blüten und Früchte. Bonn 1882.

Warner, T. H.: Über den Einfluß der geotropischen Reizung auf den Zucker- und Säuregehalt der Sprosse. Jb. wiss. Bot. **68**, 431—497 (1928).

Wiesner, J.: Die heliotropischen Erscheinungen im Pflanzenreich. Denkschr. Akad. Wiss. Wien **39**, 143—209 (1878).

Wilden, M.: Zur Analyse der positiven und negativen phototropischen Krümmung. Planta (Berl.) **30**, 286—287 (1939).

Dr. H. D. Zinsmeister,
Botanisches Institut der Universität,
München 19, Menzinger Straße 67

Planta 55, 669—686 (1960)

Aus dem Botanischen Institut der Justus Liebig-Universität zu Gießen

BIOCHEMISCHE UND ENTWICKLUNGSPHYSIOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUR FRAGE DES SCHOSSENS UND DER BLÜTENBILDUNG DER ZUCKERRÜBE*

I. Mitteilung

VERSUCHE ZUR EXPERIMENTELLEN BEEINFLUSSUNG DER BLÜTENBILDUNG UND CHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUM NACHWEIS DER FREIEN β-INDOLYLESSIGSÄURE

Von

GEROLD SCHNEIDER

Mit 4 Textabbildungen

(Eingegangen am 26. August 1960)

Einleitung

Die Blütenbildung der höheren Pflanze hat bekanntlich zwei Deutungen erfahren: Die erste, begründet von SACHS (1863), schreibt einem spezifischen Agens, dem Blühhormon, die entscheidende Rolle bei der Blütenbildung zu. In neuerer Zeit wurde die Sachssche Hormonhypothese noch erweitert, da pflanzlicher Wuchsstoff als Antagonist der reproduktiven Entwicklung erkannt worden ist (CHOLODNY 1940, v. DENFFER 1950). KLEBS (1904, 1906) führt die Blütenbildung dagegen nicht auf Hormone, sondern auf ein erhöhtes Kohlenhydrat/Stickstoff-Verhältnis, also einen Ernährungsfaktor, zurück.

Obgleich es bisher noch nicht gelungen ist, das „Blühhormon" aus der Pflanze zu isolieren, sprechen dennoch zahlreiche Ergebnisse für die Richtigkeit der Sachsschen Ansicht. Hier sind vor allem die Pfropfversuche von MELCHERS (1937, 1939) zu erwähnen, sowie die Experimente zur photoperiodischen Induktion der *Kalanchoe* (z. B. HARDER u. v. WITSCH 1940), bei denen der indirekte Nachweis eines transportablen, blühspezifischen Agens erbracht werden konnte. Die zuerst von CHOLODNY (1940) vertretene Ansicht, daß eine Senkung des Wuchsstoffspiegels zur Blütenbildung führt (Blühhemmungshypothese), wird unter anderem durch die Arbeiten von LAIBACH u. MEYER (1935) sowie COOKE (1954) gestützt: Nach ihren Ergebnissen erreicht der Wuchsstoffgehalt zur Zeit der Blütenanlage einen Minimalwert.

Für die Klebssche Hypothese sprechen die Angaben von v. DENFFER (1940) und ČAJLACHJAN (1945), die bei verschiedenen Langtagspflanzen fanden, daß durch Stickstoffmangel die Blütenbildung gefördert wird.

* Auszug aus einer Dissertation der Naturwissenschaftlich-Philosophischen Fakultät der Justus Liebig-Universität, Gießen.

Während sich der erste Teil der vorliegenden Arbeit mit Versuchen zur experimentellen Beeinflussung der Blütenbildung befaßt, werden im zweiten Teil Methoden zur chemischen Analyse des nativen Heteroauxins mitgeteilt und über den Nachweis eines β-indolylessigsäureabbauenden Prinzips berichtet.

Teil I

Zur Entwicklungsphysiologie der Zuckerrübe unter besonderer Berücksichtigung der Blütenbildung

A. Die Anzucht des Materials

Für die vorliegenden Untersuchungen wurde Saatgut mit starker Schoßtendenz gewählt, das von der Firma Rabbethge & Giesecke, Einbeck, freundlicherweise zur Verfügung gestellt worden war.

Auf die Kultivierung der Pflanzen im Freiland mußte wegen der Gefahr des Läusebefalles verzichtet werden, da dieser stets eine Virusinfektion zur Folge hat. Schwer mosaikkranke Zuckerrüben vermögen jedoch keine Blüten auszubilden (HEINISCH 1948, S. 76). Außerdem dürfte der Stoffwechsel der infizierten Pflanzen in undurchsichtiger Weise gestört werden. Deshalb wurden die Versuchspflanzen in einem läusedichten Gewächshaus kultiviert. Die Gewächshaustemperatur war leider in starkem Maße von der Außentemperatur abhängig. Bei der Beschreibung der Versuche werden die Temperaturverhältnisse, falls sie für die Entwicklung der Pflanzen von Bedeutung waren, berücksichtigt.

Die Aussaat erfolgte in erdgefüllte Kästen. Die Pflanzen wurden kurz nach ihrem Auflaufen in Töpfe von 20 cm Durchmesser pikiert (Erdgemisch: 3 Teile Gartenerde + 1 Teil Lauberde). Während ihres Wachstums war eine regelmäßige Düngung erforderlich. Dabei kamen auf etwa 1000 Töpfe:

500 g 40%iges Kali
500 g Thomasmehl
500 g Ammonsulfat
100 g Borax

Etwa auftretender Nährstoffmangel fördert sofort den Pilzbefall. Zur Beschleunigung des Wachstums vor allem im Winter wurden pro Nacht 4 Std Zusatzlicht gegeben. Als Lichtquelle dienten *Philips-Argenta*-Lampen (100 W), die im seitlichen Abstand von 1 m in 50 cm Höhe über den Pflanzen angebracht waren.

Bei den Nährlösungsversuchen wurden gründlich gereinigte Rübenkörper in reinen Quarzsand (Fa. Dorfner, Hirschau, Bayern) eingesetzt, bzw. die Samenknäuel in diesen ausgesät und mit geeigneten Nährlösungen gedüngt. Als Kulturgefäße für diese Versuche haben sich die Töpfe der Fa. Söndgen, Adendorf, aus gebranntem und glasiertem Ton von 30 cm Durchmesser und 30 cm Höhe bewährt.

B. Versuche zur experimentellen Beeinflussung der Blütenbildung

1. Die Vernalisation

Zur Induktion der Blütenbildung der Zuckerrübe sind unbedingt tiefe Temperaturen erforderlich. Rüben, die man auch im Winter einer Temperatur von mindestens 15° C aussetzt, bleiben jahrelang vegetativ (TOLMAČEV 1929). Ihr Vegetationspunkt vermag eine unbegrenzte Zahl von Blättern auszubilden. Diese Pflanzen zeichnen sich ferner

durch einen großen Rübenkopf aus, der die Narben der abgestorbenen Blätter trägt. Eine wesentliche Vergrößerung der Wurzel im 2., 3. und 4. Wachstumsjahr ließ sich nicht feststellen. 4jährige vegetative Pflanzen erwiesen sich nach einer Kältebehandlung als noch voll blühfähig.

a) Über die Vernalisation von angekeimtem Saatgut. Im Gegensatz zum Getreide muß die Zuckerrübe ein gewisses Alter erreicht haben, bevor sie mit Erfolg vernalisiert werden kann (vgl. auch: STOKES u. VERKERK 1951). So fanden SCHNEIDER (1935) und VOSS (1936), daß nur ein Teil von Rübenkeimlingen, die mit Kälte behandelt wurden, zur reproduktiven Entwicklung übergeht. Diese Versuche wurden mit angekeimtem Saatgut, das im Eisschrank vernalisiert wurde, reproduziert: Da selbst eine 8-wöchige Kältebehandlung (+3°C) ohne Erfolg blieb, läßt sich angekeimtes Zuckerrübensaatgut durch tiefe Temperaturen offenbar nicht, bzw. nur zu einem geringen Prozentsatz blühstimmen.

Zu dem Versuch ist noch bemerkenswert, daß sich in den Samenknäueln der Zuckerrübe ein Keimungshemmstoff findet (DE KOCK, HUNTER u. MACDONALD 1953). Seine Wirkung auf das Auskeimen der Zuckerrübensamen kann nach eigener Erfahrung auf dreierlei Art aufgehoben werden:

1. durch Aussaat der Knäuel in Erde oder Quarzsand,
2. durch Lüften angequollener Knäuel in einem Leinenbeutel im Freien,
3. durch Wässern der Samenknäuel mit fließendem Leitungswasser für etwa 100 Std.

In den vorliegenden Versuchen wurden die Samenknäuel meist in Erde ausgesät. Eine Ausnahme macht der Stickstoffmangelversuch, bei dem die Aussaat in Quarzsand erfolgte. Zur Vernalisation angekeimten Saatgutes wurden die Knäuel entweder gequollen und in Leinensäckchen zur Keimung gebracht oder auch mit fließendem Wasser behandelt und dann zum Keimen in Petrischalen auf feuchtes Filtrierpapier ausgelegt.

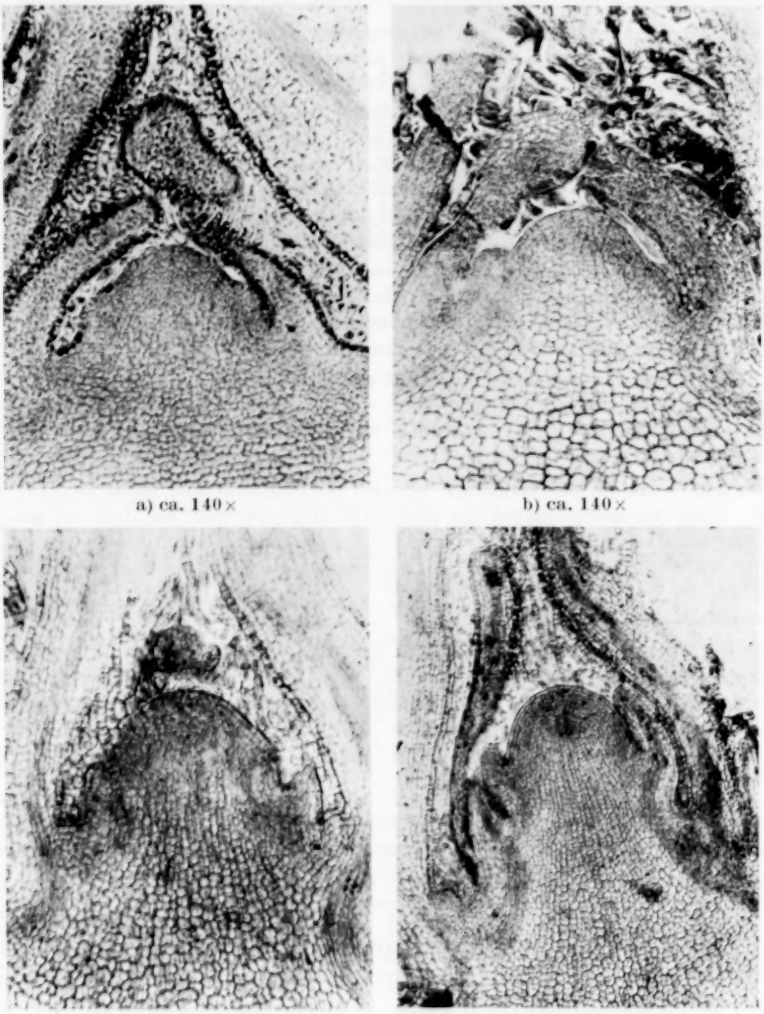
b) Die Vernalisation von einjährigen Pflanzen. Die Kältebehandlung der einjährigen Pflanzen (Aussaat im Frühjahr, Vernalisationsbeginn im Herbst) führt zu deren Blühstimmung. Die Vernalisation erfolgte entweder auf die übliche Weise in Mieten oder in erdgefüllten Kästen im Eisschrank, wobei vorher alle Blätter bis auf die jüngsten entfernt wurden. Zur Blühinduktion dieser Pflanzen genügt eine Behandlungsdauer von 40 Tagen bei 3°C.

a) Veränderungen des Vegetationspunktes beim Übergang von der vegetativen in die reproduktive Phase. Für den biochemischen Teil der vorliegenden Arbeit war es wichtig, den Zeitpunkt des Überganges von der vegetativen zur reproduktiven Entwicklung genauer zu erfassen. Dazu wurde eine mikroskopische Untersuchung des Vegetationspunktes erforderlich, die mit Hilfe von Mikrotomschnitten durchgeführt wurde.

Die Fixierung der Präparate erfolgte in Chromessigsäure (10%ige Essigsäure 10 cm³ + 1%ige Chromsäure 50 cm³ + Aqua dest. 40 cm³), die Anfärbung der Schnitte mit einer 0,1—1%igen wäßrigen Gentianaviolettlösung.

In Abb. 1 sind die Vegetationskegel von Zuckerrüben in etwa medianen Schnitten in verschiedenen Entwicklungsstadien zusammengestellt. Selbst 12wöchige Vernalisationsdauer (b) bewirkt keine deutliche morphologische Veränderung der Vegetationspunkte. Sie gleichen dem der nicht kältebehandelten Kontrollpflanzen (a). Werden 6 Wochen

lang vernalisierte Pflanzen im Gewächshaus bei Temperaturen von 15 bis 23° C gehalten, so zeigen zunächst auch deren Vegetationspunkte (c) noch keine deutlichen Unterschiede gegenüber den nicht kältebehandelten



a) ca. 140× b) ca. 140×

c) ca. 140× d) ca. 90×

Abb. 1a—h. Längsschnitte durch Zuckerrübenvegetationskegel. Ein Vergleich zwischen dem Vegetationspunkt einer vegetativen Kontrollpflanze und denen vernalisierter Exemplare beim Übergang in die sexuelle Reproduktion. Nähere Erläuterung der Abbildung im Text

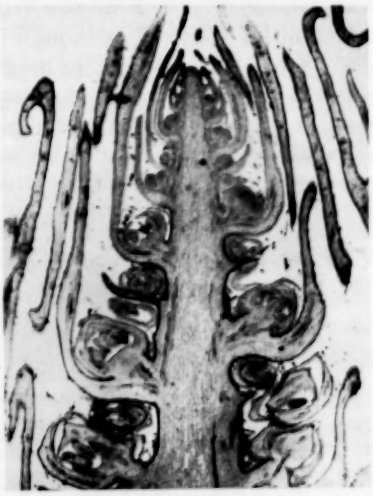
Exemplaren. Erst 2 Wochen nach der Vernalisation beginnt eine leichte Streckung der gestauchten Achse (d), die in der 4. Woche deutlicher wird (e). In diesem Stadium ist die Ausbildung der blattachsel-

ständigen Knospen besonders auffällig. Streckung und Knospenanschwellung sind eine weitere Woche später (f) fortgeschritten. Zu diesem Zeitpunkt beginnen die Pflanzen zu schossen. Die Achse der

e) ca. 90×

f) ca. 30×

g) ca. 10×



h) ca. 10×

Abb. 1 (Fortsetzung)

in Abb. 1g dargestellten Pflanze war bereits 2,5 cm hoch. Hier sind die Blütenknospen schon weitgehend ausgebildet, aber makroskopisch noch nicht sichtbar. Ähnlich sind die Verhältnisse bei „h". Die Achslänge beträgt hier 20 cm. Makroskopisch ist die Inflorescenzanlage noch gestaucht, Blütenknospen sind noch nicht als solche erkennbar.

Beim Übergang von der vegetativen in die reproduktive Entwicklungsphase erfolgt demnach zunächst die Anlage der Blütenknospen, verbunden mit einer leichten Streckung der Achse (3 Wochen nach der Vernalisation). Die Blütenknospen sind zum Zeitpunkt des makroskopisch sichtbaren Schoßbeginnes schon weitgehend differenziert (4 Wochen nach der Kältebehandlung). Die Entfaltung der ersten Blüten lag in meinen Versuchen 8—10 Wochen nach Abschluß der Kältebehandlung. Höhere Temperaturen beschleunigen, tiefere hemmen den Schoßvorgang.

β) Einfluß von Dunkelheit auf Schossen und Blütenbildung. Daß die Schoßtendenz der Zuckerrübe nach der Kältebehandlung stark ausgeprägt ist, geht aus folgender Beobachtung hervor: Beim Öffnen der Miete im Mai 1954 zeigte sich, daß bereits 30% der Pflanzen unter ungünstigen Bedingungen zu schossen begonnen hatten. Ein Teil der bereits schossenden Pflanzen wurde weiterhin in völliger Dunkelheit kultiviert. Es sollte festgestellt werden, ob Zuckerrüben in der Lage sind, im Dunkeln Blüten auszubilden. Die Pflanzen schoßten zunächst weiter und erreichten eine Höhe von durchschnittlich 70 cm; dann starben die Versuchsexemplare jedoch ab ohne zuvor geblüht zu haben.

2. UV-Bestrahlung und Blütenbildung bei der Zuckerrübe

v. DENFFER u. SCHLITT (1951) konnten zeigen, daß UV-bestrahlte Exemplare von *Statice Bonduelli* und *Linum usitatissimum* gegenüber unbestrahlten Kontrollen in ihrer Blütenbildung gefördert werden, d. h. der Termin ihres Aufblühens liegt zeitlich früher.

In meinen Versuchen diente als Strahlenquelle ein Brenner der Hanauer Quarzlampengesellschaft vom Typ S 700 mit Reflektor. Die Lampe hing in einem Abstand von 50 cm über den Pflanzen, so daß die Temperaturerhöhung durch den Brenner unbedeutend war. Ein Vorversuch zeigte, daß bei einer länger fortgesetzten (6 Monate) täglichen Bestrahlung von 5 min Dauer die Pflanzen zwar in ihrem Wachstum gehemmt werden, aber noch nicht absterben. Diese Bestrahlungsdauer pro Tag wurde deshalb als Maximaldosis eingesetzt.

Da Vorversuche ergeben hatten, daß die Schädigung der Pflanzen größer ist, wenn die Behandlung nach einer vorangegangenen Dunkelperiode erfolgt, wurden die Zuckerrüben stets am Nachmittag bestrahlt.

1 Jahr alte Pflanzen wurden 6 Monate lang täglich 2 bzw. 4 min bestrahlt. Darauf erfolgte eine natürliche Vernalisation in einem schwach geheizten Gewächshaus (6 Wochen lang Durchschnittstemperaturen von 10,5°C, in den Nachtstunden häufig bis auf 3°C absinkend), während der die Bestrahlung fortgesetzt wurde.

Es zeigte sich, daß das ultraviolette Licht die Blütenbildung der Rüben hemmt. Der Schoßbeginn wurde kaum beeinflußt, die Spanne zwischen Schoßbeginn und Aufblühen dagegen teilweise wesentlich verlängert. So blühten die 6 Versuchspflanzen, denen täglich 4 min UV gegeben wurde, erst 20 Tage nach den unbestrahlten Kontrollen auf. Gleichzeitig war die Länge des Blütentriebes reduziert. Die Pflanzen, die geringere Tagesdosen erhielten (2 min), waren weniger stark, aber

dennoch eindeutig in ihrer Blütenbildung gehemmt. Bei ihnen war der Aufblühtermin um 4—12 Tage verzögert.

Pflanzen, die über einen kürzeren Zeitraum, z. B. erst vom Schoßbeginn an bestrahlt wurden, blühten gleichzeitig mit den Kontrollen auf.

3. Der Einfluß von Wuchsstoff und Trijodbenzoesäure auf die Blütenbildung der Zuckerrübe

Durch die Untersuchungen von v. DENFFER u. GRÜNDLER (1950) sowie v. SENDEN (1951) ist bekannt geworden, daß Pflanzen, denen Wuchsstoff künstlich zugeführt wird, in ihrem Aufblühen gehemmt werden können, während nach den Erfahrungen von DE WAARD u. ROODENBURG (1948) der Wuchsstoffantagonist Trijodbenzoesäure bei anderen Arten eine Beschleunigung der Blütenbildung bewirkt.

Je 5 vernalisierte Zuckerrübenexemplare wurden deshalb mit β-Indolylessigsäure- bzw. Trijodbenzoesäurelösung (10^{-4} und 10^{-5} g/cm³) im Abstand von 3 Tagen gesprüht. Ein Einfluß auf die Blütenbildung war in keinem Falle festzustellen.

4. Stickstoffmangelernährung und Blütenbildung

Auch Stickstoffmangel in der Nährlösung bleibt auf die Blütenbildung zweijähriger Rüben ohne Einfluß. Die Rübenkörper vernalisierter Pflanzen wurden dazu in Quarzsand eingesetzt und teils täglich mit 0,13 g KCl, teils mit 0,13 g KNO_3 in 250 cm³ Leitungswasser (Stickstoffgehalt des Gießener Leitungswassers: 9—15 mg/Liter NO_3^-) gedüngt. Das Aufblühen der stickstoffarmen und stickstoffreichen Kulturen erfolgte gleichzeitig. Die mit Kaliumchlorid gedüngten Pflanzen waren allerdings in ihrem Wuchs bedeutend schwächer als die Stickstoffpflanzen.

Es ließ sich vermuten, daß die Wurzeln im ersten Wachstumsjahr Stickstoff in genügender Menge gespeichert hatten, so daß die Blütenbildung durch den im zweiten Wachstumsjahr eingetretenen Stickstoffmangel nicht mehr zu beeinflussen war.

Deshalb wurde in einem zweiten Versuch das Saatgut direkt in Quarzsand ausgesät und mit stickstoffarmer und stickstoffreicher Nährlösung (nach VAN DER CRONE: 20 cm³ + 1 cm³ Erddekokt = Tagesmenge für etwa 50 Pflanzen nach Auffüllen auf 8 Liter) gedüngt. In der stickstoffarmen Nährlösung wurde das KNO_3 durch in Bezug auf das Kalium äquivalente Mengen KCl ersetzt.

Sowohl die Mangelpflanzen als auch die stickstoffreichen wuchsen unter diesen Bedingungen nur zu Kümmerformen heran. Beide Serien wurden im Frühbeet vernalisiert. Das Ergebnis des Versuches ist insofern überraschend, als die Versuchspflanzen — sowohl die stickstoffarmen als auch die stickstoffreichen — rein vegetativ blieben, während die unter den gleichen Bedingungen wie die Versuchsexemplare vernalisierten, aber in Erde kultivierten Kontrollpflanzen schoßten und Blüten ausbildeten. Damit steht der Versuch in Übereinstimmung mit den Ergebnissen

von LÜDECKE (1938), der fand, daß Hungerexemplare von Zuckerrüben durch tiefe Temperaturen nicht blühgestimmt werden können.

5. Versuche zur partiellen Vernalisation der Zuckerrübe bei Exemplaren mit zwei Blattrosetten

Vegetative Zuckerrüben wurden etwa 1,5 cm unterhalb des Vegetationspunktes decapitiert. Daraufhin kommt es zum Austreiben mehrerer „schlafender" Blattachselknospen am Rande der Schnittstelle. Pro Pflanze wurden 2 dieser vegetativen Triebe belassen, die restlichen entfernt. Nachdem jeder dieser beiden Triebe einen etwa 5 cm langen Rosettensproß ausgebildet hatten, erfolgte die Vernalisation des einen Sprosses durch Einführen in eine Kältetruhe. Die zweite Rosette und die Wurzel derselben Pflanze blieben während der Dauer der partiellen Vernalisation (6 Wochen bei 3° C und natürlichem Tageslicht) weiterhin der Zimmertemperatur ausgesetzt.

Abb. 2. Zuckerrübe mit 2 Trieben auf einer Wurzel. Linker Trieb vernalisiert, rechter Trieb unbehandelt. Nähere Erläuterung im Text

Diese partielle Vernalisation hat lediglich Schossen und Blütenbildung des vernalisierten Sprosses zur Folge; der unbehandelte Trieb auf ein und derselben Pflanze bleibt rein vegetativ. Diese Verhältnisse sind in Abb. 2 veranschaulicht. Der linke, für sich allein vernalisierte Sproß schoßte, blühte und bildete nach einer Devernalisation[1] wieder eine Rosette aus. Der rechte unbehandelte Sproß blieb vegetativ.

Teil II

Chemische Untersuchungen zum Nachweis der freien β-Indolylessigsäure in der Zuckerrübe

Das Heteroauxin konnte bisher in nur wenig Pflanzenarten chemisch exakt nachgewiesen werden. So fanden JERSCHEL u. MÜLLER (1951)

[1] Schon bereits blühende Zuckerrübenexemplare lassen sich noch mit Erfolg devernalisieren (MARGARA 1958). Dadurch, daß sich an der Spitze der Achse eine neue Blattrosette bildet, nehmen die Pflanzen einen palmenartigen Habitus an. Bedeutungsvoll ist, daß so behandelte Exemplare ihre Früchte zur Reife bringen und danach nicht absterben, obwohl die Zuckerrübe zu den hapaxanthen Pflanzen zu rechnen ist.

die β-Indolylessigsäure in Maiskörnerextrakten. FISCHER (1954) und LINSER (1954) konnten unabhängig voneinander diesen Wuchsstoff in verschiedenen Kohlarten nachweisen. Dagegen gelang es VLITOS u. MEUDT (1953) nicht, freies Heteroauxin in Gersten-, Tabak-, Spinat- und Tomatenmaterial aufzufinden.

Trotz des negativen Befundes, den die Wuchsstoffbehandlung über den möglichen Zusammenhang zwischen β-Indolylessigsäure und Blütenbildung bei der Zuckerrübe erbrachte, schien es dennoch ratsam zu versuchen, den nativen Wuchsstoffgehalt möglichst während des Überganges in die reproduktive Entwicklung zu bestimmen. Primär blieb festzustellen, ob die Zuckerrübe freie β-Indolylessigsäure in nachweisbarer Konzentration enthält.

Für den Nachweis der pflanzeneigenen β-Indolylessigsäure stehen 2 Methoden zur Verfügung: der biologische Test und der chemische Nachweis. Der biologische Test ist zwar empfindlicher (Nachweisgrenze: 10^{-7} bis 10^{-12} g/cm³) als der chemische Nachweis (Nachweisgrenze: 10^{-5} g/cm³), dafür aber sehr viel unspezifischer.

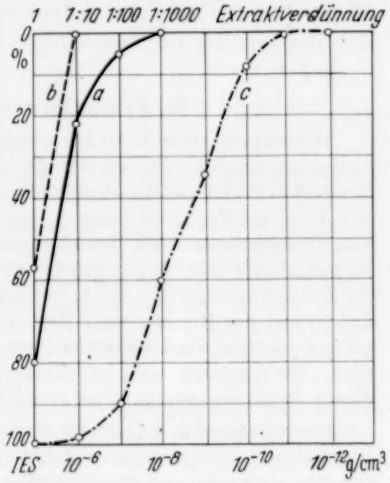


Abb. 3. Die Wirkung von alkoholischen Zuckerrübenblattextrakten (*a*) und deren Ätherfraktionen (*b*) auf das Wachstum von Lepidiumwurzeln. Im Vergleich dazu eine Wirkkurve mit synthetischer β-Indolylessigsäure (*c*). Die Hemmung des Wurzelwachstums ist in Prozent der Wasserkontrolle angegeben (Ordinate)

A. Der biologische Test

Der relativ einfachen Durchführbarkeit wegen wurde der Lepidiumtest nach MOEWUS (1949) gewählt, der in orientierenden Vorversuchen zeigen sollte, ob in Zuckerrübenblättern Wuchsstoff nachweisbar ist. Auf Grund der Ergebnisse einer kritischen Untersuchung des Testes (CLAUSS 1952) sowie eigener Erfahrung ist lediglich der Gesamtverlauf der Kurve, die aus Wachstumshemmung und der Extraktverdünnung resultiert, von Interesse.

Zwei Extraktarten wurden in ihrer Wirkung auf das Wachstum der Kressewurzel geprüft:

1. Rohauszüge: 10 g frische Zuckerrübenblätter wurden mit 100 cm³ Methanol 2 Std bei 70°C am Rückflußkühler extrahiert, der Alkohol im Vakuum abgedampft und der Trockenrückstand mit 20 cm³ Aqua bidest. aufgenommen. Ausgehend von dieser Konzentration wurden Verdünnungsreihen mit dem Faktor 10 hergestellt.

2. Ätherfraktionen: Um die etwa vorliegenden Wuchsstoffe von den toxisch auf Wurzeln wirkenden Salzen (BORRISS 1937) abzutrennen, wurde eine Fraktionierung der Rohextrakte mit Äther vorgenommen. Das Lösungsmittel dieser Fraktionen wurde ebenfalls abgedampft, die trocknen Rückstände mit Aqua bidest. aufgenommen und wie oben verdünnt.

Charakteristisch für die Alkoholextrakte in höherer Konzentration ist ihre starke wachstumshemmende Wirkung auf Lepidiumwurzeln (Abb. 3a). Nach 100facher Verdünnung sind sie aber schon praktisch wirkungslos. Die Kurven verlaufen steil und deuten auf die Wirkung von Hemmstoffen, bzw. toxisch wirkenden Ionen hin. Die Ätherfraktionen der Alkoholextrakte hemmen das Wurzelwachstum weniger stark als Gesamtauszüge, zeigen aber einen ähnlichen Kurvenverlauf (Abb. 3b) und ergeben ebenfalls keine zu sichernde Wachstumsförderung. Diese Ergebnisse deuten bereits darauf hin, daß nativer Wuchsstoff in der Zuckerrübe nur in geringer Menge vorzuliegen scheint.

B. Versuche zum chemischen Nachweis

Die angeführten Extrakte wurden außerdem auch unmittelbar auf β-Indolylessigsäure geprüft. Sie wurden dazu stark eingeengt und mit dem von GORDON u. WEBER (1951) modifizierten Salkowski-Reagens auf Indolderivate versetzt. Der sich bildende Farbstoff kann — handelt es sich bei ihm um das Reaktionsprodukt von Indolderivaten mit dem Reagens — mit Amylalkohol ausgeschüttelt werden. Es zeigte sich aber in keinem Falle eine eindeutige Reaktion. LEFÈVRE (1939) hat für Zuckerrübenblätter eine Heteroauxinkonzentration von 10^{-6} des Frischgewichtes auf Grund der Reaktion mit Indolkernreagentien angegeben. Dabei ist jedoch zu berücksichtigen, daß die verwendeten Reagentien weder stoff- noch klassespezifisch sind. Sie reagieren auch mit Zuckern (s. dazu II. Mitt.) sowie Phenolen. Ein Teil dieser Reaktionsprodukte ist ebenfalls in Amylalkohol löslich.

Deshalb wurden Papierchromatographie und Papierelektrophorese zur Analyse angereicherter Zuckerrübenextrakte verwendet. Diese Methoden haben sich bereits für den Nachweis von Wuchsstoffen in pflanzlichen Auszügen bewährt (JERSCHEL u. MÜLLER 1951, FISCHER 1954, VLITOS u. MEUDT 1953 u. a.).

Die Extraktion des Wuchsstoffes kann mit Alkohol durchgeführt werden. Das im Star-Mix homogenisierte Material (1,3 kg Zuckerrübenblätter) wurde 2 Std mit 4,5 Liter Äthanol am Rückflußkühler bei 70°C extrahiert, der Extrakt abgenutscht und zur Anreicherung der Indolderivate evaporiert. Die verbleibende sirupöse Masse wurde in 100 cm³ Wasser gelöst. Die so erhaltene Lösung ist papierchromatographisch nicht analysierbar. Deshalb war eine weitere Reinigung der Rohfraktion unumgänglich.

Eine Differenzierung dieser Fraktion mit Äther führte nicht zum Erfolg, da sich organische und wäßrige Phase nicht trennen lassen, vielmehr eine homogene Schaumbildung stattfindet. Ferner wurden neben der von LINSER (1951) für die Anreicherung von Indolderivaten aus Kohlextrakten angegebenen chromatographischen Adsorptionsanalyse auch die Sublimation nach BEHRENS u. FISCHER (1954) sowie eine Fraktionierung der Extrakte durch Bleiessigfällung geprüft. Nähere Angaben über diese Versuche finden sich bei SPARMANN (1958).

Geeigneter als die genannten Fraktionierungsmethoden ist die Ultrafiltration (SPARMANN u. SCHNEIDER 1955), bei der eine Trennung der hochmolekularen von den niedermolekularen Substanzen erfolgt. Das Ultrafiltrat wurde 3mal jeweils mit je 1 Liter Äther (sauer und alkalisch) ausgeschüttelt, der Äther abgedampft und der bleibende Rückstand mit 1,5 cm³ Alkohol aufgenommen. Davon wurden 0,2 cm³ pro Filtrierpapierstreifen (4 cm breit) zur Papierchromatographie verwendet. SPARMANN (1958) fand als günstigstes Lösungsmittel für die papierchromatographische Fraktionierung der Indolderivate das Gemisch Isopropanol-

Wasser-Ammoniak (80:15:2). Die Entwicklung der Streifen erfolgte nach der aufsteigenden Arbeitsweise.

Außerdem eignet sich bei der Wahl geeigneter Puffer die Papierelektrophorese bei hohen Spannungen gut zur Analyse synthetischer Indolderivate (SCHNEIDER u. SPARMANN 1955a). Erfahrungsgemäß darf hier eine Versuchsdauer von 45 min nicht überschritten werden, wenn man mit einer Spannung von 3000 V arbeitet. Stoffe mit hoher Wanderungsgeschwindigkeit ergeben sonst keine scharfe Trennung mehr. Die Wanderungsgeschwindigkeit selbst bleibt nach einem anfänglich hohen Wert nach einer Versuchsdauer von 15 min annähernd konstant, wie aus Abb. 4 am Beispiel synthetischer β-Indolylessigsäure zu ersehen ist.

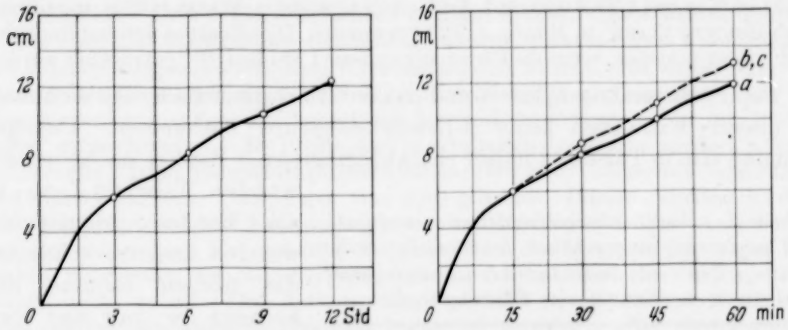


Abb. 4. Vergleich zwischen der Wanderungsgeschwindigkeit eines Stoffes bei Niedervolt- und Hochspannungs-Papierelektrophorese (Modellsubstanz: synthetische β-Indolylessigsäure). Links: Elektrophorese bei 220 V mit unverdünntem Puffer. Rechts: Elektrophorese bei etwa 3000 V mit verdünntem (1:64) Puffer. Man beachte den nur geringen Einfluß einer Pufferemeuerung auf die Wanderungsgeschwindigkeit. *a* ohne Pufferemeuerung, *b* Pufferemeuerung nach je 15 min, *c* ständige Pufferemeuerung durch Umlauf. Puffer: Essigsäure-Natriumacetat nach WALPOLE, $p_H = 5{,}3$

SCHNEIDER u. SPARMANN (1955a) fanden außerdem eine einfache Methode, die es gestattet, die sonst bei der Hochspannungs-Papierelektrophorese erforderliche Kühlung des Trägerpapiers durch eine geeignete Pufferverdünnung zu umgehen. Die Stoffwanderung ist in gewissen Grenzen von der Pufferverdünnung unabhängig, obwohl mit steigender Pufferverdünnung der durch die Trägerstreifen fließende Strom abnimmt (Tabelle 1). Wie aus Abb. 4 weiter hervorgeht bewirkt eine kontinuierliche Erneuerung des Puffers in den Elektrodenräumen der Elektrophoresekammer nur eine geringe Zunahme der Wanderungsgeschwindigkeit der zu analysierenden Substanzen. Deshalb kann im allgemeinen darauf verzichtet werden.

Tabelle 1. *Der Einfluß der Pufferverdünnung auf die Stoffwanderung im elektrischen Feld*

Testsubstanz: β-Indolylessigsäure (Merck); Essigsäure-Natriumacetatpuffer nach WALPOLE, $p_H = 5{,}3$; Spannung etwa 3000 V, Versuchsdauer je 30 min; Streifen: Schleicher & Schüll, 2043b Mgl (30 × 2 cm)

Pufferverdünnung	Stomstärke pro Streifen in mA	Wanderungsstrecke in cm	Temperatur am Streifen (geschätzt)
1:8	2,8	7	etwa 40—50° C
1:16	1,5	7	etwa 30° C
1:32	1,0	7	etwa Zimmertemperatur
1:64	0,7	7	

Genaue Angaben über die R_f-Werte der einzelnen Indolderivate sowie deren Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld, auch die Abhängigkeit der Wanderung von der Lage der Auftragsstelle zu den Elektroden finden sich bei MELCHIOR (1957/58) und SPARMANN (1958).

Als empfindlichstes Reagens zum Sprühen wurde ein Gemisch von 50 Teilen $HClO_4$, 5%ig und 1 Teil 0,05 mol. $FeCl_3$ nach GORDON u. WEBER (1951), modifiziert nach BENNET-CLARK u. Mitarb. (1952) verwendet. Die Reaktion ist empfindlicher und erfolgt schneller, wenn die Chromatogramme 1 Std bei 50°C getrocknet werden.

Papierchromatographisch und papierelektrophoretisch ließ sich auch in diesen Extrakten keine β-Indolylessigsäure nachweisen. Dagegen konnten die in Tabelle 2 näher charakterisierten 5 Banden nachgewiesen werden. Während Zone „1" als Fructose identifiziert werden konnte, stimmten die übrigen Banden mit keinem der mir zur Verfügung stehenden synthetischen Indolderivate überein. Die Frage, ob es sich bei den gefundenen Substanzen überhaupt um Indolderivate handelt, muß daher offenbleiben.

Tabelle 2. *Aus Zuckerrübenblättern extrahierte und papierchromatographisch fraktionierte Substanzen, die mit dem Indolkernreagens nach* GORDON u. WEBER *eine Färbung ergeben*

Bezeichnung der Banden	Färbung mit dem Perchlorsäure-reagens n. GORDON u. WEBER	R_f-Wert in Isoprop.-Wasser-Ammoniak n. SPARMANN (1958)	Indentifizierung
1	grün-schwarz	0,33	Fructose
2	schmutzig-gelb	0,53	?
3	schmutzig-gelb	0,64	?
4	violett	0,84	?
5	rot	0,95	?

Erst nach alkalischer Hydrolyse einer eiweißhaltigen Fraktion (Niederschlag der Bleiessigfällung) von Zuckerrübenblattextrakten konnte die β-Indolylessigsäure neben Tryptophan einwandfrei nachgewiesen werden. Nach den Angaben von VLITOS u. MEUDT (1953) wird auf diese Weise die an Zellkomponenten gebundene β-Indolylessigsäure in Freiheit gesetzt. SPARMANN (1958) fand aber, daß unter den Bedingungen der alkalischen Hydrolyse synthetisches Tryptophan zu β-Indolylessigsäure abgebaut wird. Es ist daher wahrscheinlich, daß ein erheblicher Teil des Heteroauxins, das nach alkalischer Hydrolyse des Pflanzenextraktes gefunden wurde, aus dem Tryptophanabbau stammt.

C. Der Nachweis eines β-indolylessigsäure-abbauenden Prinzips aus Zuckerrübenblättern

Ein Grund dafür, daß freie β-Indolylessigsäure in der Zuckerrübe nicht nachgewiesen werden konnte, liegt möglicherweise an einem spontanen Abbau des eben frei gewordenen Wuchsstoffes in der Pflanze. Schon 1947 haben TANG u. BONNER erstmalig ein heteroauxin-abbauendes Ferment in etiolierten Erbsenepikotylen nachgewiesen.

Um die β-indolylessigsäure-abbauende Wirkung von Zuckerrübenblättern zu prüfen, wurde annähernd nach der von TANG u. BONNER (1948) angegebenen Arbeitsweise verfahren:

300 g frische Rübenblätter wurden zusammen mit 100 cm^3 Wasser homogenisiert und ausgepreßt, der Preßsaft nach dem Zentrifugieren und Filtrieren langsam

unter ständigem Umschütteln mit 80 cm³ Aceton versetzt. Es fiel sofort ein flockiger Niederschlag aus, der sich nach Abkühlen der Lösung auf 0°C nach 2 bis 3 Std noch vermehrt hatte. Nach dem Zentrifugieren wurde der Niederschlag mit 20 cm³ Phosphatpuffer ($p_H = 6{,}5$) aufgenommen und erneut zentrifugiert. Der von den Zuckerrübenblattextrakten gewonnene Acetonniederschlag ist im Puffer praktisch unlöslich. TANG u. BONNER fanden in dieser Fraktion das wirksame Enzym.

Die nach der Acetonfällung verbleibende wäßrige Fraktion sollte ebenfalls auf ihre β-indolylessigsäure-abbauende Wirkung geprüft werden. Sie wurde dazu im Vakuum bei Zimmertemperatur auf ein Volumen von 15 cm³ eingeengt. Der im Phosphatpuffer ungelöste Rückstand des Acetonniederschlages wurde mit 10 cm³ Puffer aufgeschwemmt. Je 10 cm³ der so erhaltenen Lösungen wurden 0,5 cm³ synthetische β-Indolylessigsäure (Konzentration: 10^{-3} g/cm³) zugegeben und 20 Std im Dunkeln auf einer Temperatur von 29°C gehalten. Danach wurden 0,1 cm³ je Lösung sofort auf das Chromatographiepapier aufgetragen. — Eine Ausschüttelung des zugesetzten Heteroauxins mit Äther aus den Lösungen ist wegen der starken Adsorption der β-Indolylessigsäure an hochmolekularen Stoffen (z. B. Eiweiß) nicht ratsam. Die Ausbeute an Wuchsstoff durch Fraktionierung mit Äther ist bei eiweißreichen Lösungen bedeutend geringer als bei proteinarmen. Dagegen braucht erfahrungsgemäß bei der direkten papierchromatographischen Analyse dieser Lösungen nicht mit meßbaren Verlusten gerechnet zu werden.

Während die Fermentfraktion, Pufferaufschwemmung des ungelösten Fällungsrückstandes und die Kontrolle (10 cm³ Puffer + 0,1 cm³ β-Indolylessigsäure 10^{-3} g/cm³) nach einer Versuchsdauer von 40 Std in ihrem Wuchsstoffgehalt übereinstimmten[1], war die β-Indolylessigsäure in der eingeengten wäßrigen Fraktion der Acetonfällung gerade eben noch papierchromatographisch nachweisbar. Das in der Zuckerrübe vorliegende wuchsstoff-abbauende Prinzip kann nicht mit dem von TANG u. BONNER gefundenen übereinstimmen, da der Acetonniederschlag des Zuckerrübenextraktes wirkungslos ist, während sich die abbauende Komponente in dem Filtrat der Acetonfällung findet.

Als einziges Abbauprodukt der β-Indolylessigsäure ließ sich der β-Indolaldehyd mit dem Benzidinreagens nach YAMAKI u. NAKAMURA (1952) papierchromatographisch nachweisen. Seine Konzentration betrug etwa 1—2 γ (Schätzwert) pro 0,2 cm³ der Lösung. Da die Konzentration des gefundenen β-Indolaldehyds unter dem theoretisch zu erwartenden Wert liegt, läßt sich vermuten, daß der β-Indolaldehyd nicht das Endprodukt des β-Indolylessigsäure-Abbaues ist; es scheint vielmehr zur Spaltung des Indolkernes des Heteroauxins zu kommen. — Demnach wirkt das aus der Zuckerrübe gewonnene System auch auf andere Weise auf das Heteroauxin ein, als das von TANG u. BONNER (1947) extrahierte Enzym aus Erbsenkeimlingen, da hier der Indolkern beim β-Indolylessigsäure-Abbau erhalten bleibt (WAGENKNECHT u. BURRISS 1950). Letztgenannte Autoren finden ähnliche Verhältnisse auch bei einem aus Bohnenwurzeln extrahierbaren β-indolylessigsäure-inaktivierenden System.

Weitere Versuche dienten der näheren Charakterisierung der extrahierten Substanz. Zur erneuten Extraktion wurde die gleiche Methode verwendet wie für den

[1] Über die quantitative Auswertung der Chromatogramme s. II. Mitteilung.

Nachweis des Prinzips. Es interessierte allein die nach der Acetonfällung ververbliebene, eingeengte wäßrige Fraktion.

5 cm³ davon wurden mit 0,25 cm³ β-Indolylessigsäure-Lösung ($C = 10^{-3}$ g/cm³) versetzt und dienten als Kontrolle des Heteroauxin-Abbaues durch die unbekannte Substanz. Weitere 5 cm³ der zu prüfenden Lösung wurden ultrafiltriert, der Filterrückstand mit 5 cm³ Wasser aufgenommen und ihm sowie dem Filtrat je 0,25 cm³ einer β-Indolylessigsäure-Lösung ($C = 10^{-3}$ g/cm³) zugesetzt. 5 cm³ des wäßrigen Filtrates der Acetonfällung wurde nach kurzem Aufkochen die angegebene Menge Heteroauxin zugegeben. Als Kontrolle dienten 5 cm³ Wasser, dem die gleiche Wuchsstoffmenge zugefügt war. Die Durchführung des Versuches erfolgte bei 30°C im Dunkeln. Vor der papierchromatographischen Analyse wurden alle Lösungen mit Wasser auf 10 cm³ aufgefüllt und davon je 0,2 cm³ pro Filtrierpapierstreifen aufgetragen und analysiert.

Die Versuchsergebnisse sind in Tabelle 3 zusammengefaßt. Der für die Kontrollen ermittelte Wert beträgt auch nach einer Versuchsdauer von 68 Std noch 5 γ pro 0,02 cm³ (das entspricht der zugesetzten Heteroauxinmenge). Damit stimmt nach einer Versuchsdauer von 20 Std auch das Filtrat der Ultrafiltration des Acetonrückstandes noch überein, während sein β-Indolylessigsäure-Gehalt erst nach 68 Std etwas unter den Kontrollwert abgesunken ist. Als Maß des Heteroauxin-Abbaues kann das mit β-Indolylessigsäure versetzte Filtrat der Acetonfällung dienen. Es enthält nach 68 Std Versuchsdauer nur noch 2 γ β-Indolylessigsäure pro 0,2 cm³ Lösung. Der Abbau des Heteroauxins erfolgt in ähnlicher Weise durch den bei der Ultrafiltration nicht filtrierbaren Anteil des Acetonrückstandes sowie durch den aufgekochten Acetonrückstand. Der Versuch zeigt, daß es sich bei dem aus Zuckerrübenblättern extrahierbaren β-indolylessigsäureabbauenden Prinzip um eine hochmolekulare, wasserlösliche Substanz handelt, die durch kurzes Aufkochen nur unwesentlich an Wirkung verliert. Dieser Befund steht in Übereinstimmung mit den Angaben von KENTEN (1955). Er stellt fest, daß aus Bohnenwurzeln ebenfalls eine hitzebeständige β-indolylessigsäure-abbauende Komponente extrahiert werden kann. Über eine Identität des genannten Prinzipes mit dem aus der Zuckerrübe extrahierten können keine weiteren Angaben gemacht werden.

Tabelle 3. *Der Abbau der β-Indolylessigsäure durch ein wirksames Prinzip aus Zuckerrübenblättern und dessen nähere Charakterisierung*

Versuchsanordnung	Dauer der Fermenteinwirkung	
	20 Std γ IES	68 Std γ IES
Acetonfiltrat-IES	4,7	2,0
Ultrafiltration: Filtrat-IES	5,0	4,5
Ultrafiltration: Filterrückstand-IES	4,8	2,2
Aufgekochter Acetonrückstand-IES	4,6	2,9
Kontrolle	5,0	5,0

Schließlich muß noch erwähnt werden, daß alle angeführten heteroauxin-abbauenden Systeme aus etiolierten Pflanzenorganen extrahiert wurden und daß in den entsprechenden grünen Organen — soweit diese untersucht sind — ein β-indolylessigsäure-inaktivierendes Enzym nicht

nachgewiesen werden konnte (TANG u. BONNER 1948). Dagegen findet sich das wirksame Prinzip aus der Zuckerrübe in Extrakten, die von grünen Blättern stammen. Auch diese Tatsache deutet neben der Wirkungsweise ebenfalls darauf hin, daß das aus der Zuckerrübe gewonnene System mit den übrigen wahrscheinlich nicht identisch ist.

Offenbleiben muß auch die Frage, ob das Fehlen des freien Heteroauxins in nachweisbarer Konzentration bei der Zuckerrübe auf die Tätigkeit des gefundenen β-indolylessigsäure-abbauenden Prinzips zurückgeführt werden kann. Dies wäre, bei der gefundenen geringen Aktivität des abbauenden Prinzips, dann denkbar, wenn freie β-Indolylessigsäure stets nur in geringer Menge gebildet würde. Auf die Richtigkeit dieser Annahme deutet der Versuch zum chemischen Nachweis des freien Heteroauxins aus Zuckerrübenblättern hin. Unter den Bedingungen der Extraktion dieses Wuchsstoffes darf angenommen werden, daß das abbauende Prinzip inaktiviert wird. Würden von ihm aber größere Wuchsstoffmengen abgebaut, so müßten sich diese jetzt nachweisen lassen.

Teil III

Besprechung der Ergebnisse

Durch partielle Vernalisation bei der Zuckerrübe kann ein Rosettensproß zur reproduktiven Entwicklung umgestimmt werden während auf derselben Pflanze ein zweiter unbehandelter Sproß vegetativ bleibt. Daher muß angenommen werden, daß bei diesem Objekt kein Blühhormon gebildet wird. Dieses sollte sich bekanntlich durch seine Transportierbarkeit auszeichnen (MELCHERS 1937, 1939, sowie HARDER u. v. WITSCH 1940) was zur Folge hätte, daß durch Übertragung des Blühimpulses der zweite Sproß ebenfalls schossen und blühen sollte.

Auch die Blühhemmungshypothese (v. DENFFER 1950) scheint für die Zuckerrübe nicht anwendbar zu sein, da weder durch Besprühen mit β-Indolylessigsäure-Lösungen noch durch Behandlung mit dem Wuchsstoffantagonisten Trijodbenzoesäure oder durch UV-Bestrahlung eine Beeinflussung der Blütenbildung im Sinne dieser Hypothese stattfindet.

Schließlich konnte auch bei vernalisierten, einjährigen Zuckerrüben keine Abhängigkeit des Aufblühtermins von dem verabfolgten Stickstoff festgestellt werden[1]. Einjährige, vernalisierte Hungerexemplare blieben sogar rein vegetativ. Demnach scheint auch die Klebssche Hypothese, daß die Blütenbildung der Pflanzen die Folge eines erhöhten C/N-Verhältnisse ist, für die Zuckerrübe nicht zuzutreffen.

Somit läßt sich bei der Zuckerrübe auf Grund der beschriebenen Versuche der Einsatz der sexuellen Reproduktion nach keiner der gegen-

[1] Nach den Untersuchungen von GREGORY u. BAPTISTE (1936) kann durch Stickstoffmangel in der Nährlösung das C/N-Verhältnis der Gerste experimentell beeinflußt werden.

wärtig geläufigen Hypothesen erklären. Es schien daher wünschenswert, die Pflanzen während des ungestörten Überganges von der vegetativen in die reproduktive Phase chemisch zu analysieren um zu sehen, ob vielleicht qualitative und quantitative chemische Unterschiede verschiedener Stoffklassen mit diesem Übergang in Zusammenhang stehen. Darüber soll in einer folgenden Mitteilung berichtet werden.

Zusammenfassung

A. Zur Entwicklungsphysiologie der Zuckerrübe unter besonderer Berücksichtigung der Blütenbildung.

1. Durch thermische Induktion wird der Vegetationskegel morphologisch nicht verändert. 14 Tage nach Abschluß der Vernalisation beginnt er sich leicht zu strecken. 2 Wochen später hat die Differenzierung der Blütenknospen eingesetzt. Erst jetzt beginnt die starke Streckung der Achse, das „Schossen".

2. Hungerexemplare können durch tiefe Temperatur nicht blühgestimmt werden.

3. Nach partieller Vernalisation erfolgt keine Übertragung des Blühimpulses auf die nichtbehandelten Organe; auf ein und derselben Wurzel können nebeneinander vegetative und reproduktive Triebe beobachtet werden.

4. Die Bestrahlung mit geringen Dosen ultravioletten Lichtes wirkt auf die Blütenbildung hemmend.

5. Besprühen vernalisierter Pflanzen mit β-Indolylessigsäure bzw. Trijodbenzoesäure hat keinen Einfluß auf den Aufblühtermin.

6. Die Blütenbildung derjenigen Pflanzen, die nach Abschluß der thermischen Induktion in Sandkulturen unter Stickstoffmangel kultiviert wurden, blieb unbeeinflußt.

B. Chemische Untersuchungen zum Nachweis der freien β-Indolylessigsäure in der Zuckerrübe.

1. Der Heteroauxinnachweis konnte weder im biologischen Test noch durch chemische Methoden erbracht werden.

2. Durch ein aus grünen Zuckerrübenblättern extrahiertes Prinzip wird synthetische β-Indolylessigsäure abgebaut. Es handelt sich um einen hochmolekularen, wasserlöslichen und hitzebeständigen Stoff.

Literatur

BEHRENS, M., u. A. FISCHER: Zerlegung von Stoffgemischen und Identifizierung von chemischen Substanzen durch Verdampfen und Kondensieren in einem Wärmegradienten. Naturwissenschaften **41**, 13 (1954).

BENNET-CLARK, T. A., M. S. TAMBIAH and N. P. KEFFORD: Estimation of plant growth substances by partition chromatography. Nature (Lond.) **169**, 452—453 (1952).

Borriss, H.: Die Beeinflussung des Streckungswachstums durch Salze. I. Die Wirkungen von reinen Salzlösungen auf das Wachstum etiolierter Keimlinge. Jb. wiss. Bot. **85**, 732—769 (1937).

Čajlachjan, M. Ch.: Flowering in different plant species as a response to nitrogenous food. C.R. Acad. Sci. URSS. **47**, H. 2, 146—149 (1945).

*Cholodny, N. C.: Phytohormones, growth and development of plants. J. bot. Acad. Sci. RSS. Ukraine **1**, 237—252 (1940).

Clauss, H.: Kritische Untersuchungen über den Kressewurzeltest nach Moewus. Z. Naturforsch. **7b**, 112—117 (1952).

Cooke, A. R.: Changes in free auxin content during the photoinduction of short-day plants. Plant Physiol. **29**, 440—444 (1954).

Denffer, D. v.: Über die Wechselbeziehungen zwischen Stickstoffbedürfnis und photoperiodischer Reaktion bei einigen Lang- und Kurztagpflanzen. Planta (Berl.) **31**, 418—447 (1940).

— Blühhormon oder Blühhemmung? Neue Gesichtspunkte zur Physiologie der Blütenbildung. Naturwissenschaften **37**, 296—301, 317—321 (1950).

—, u. H. Gründler: Über wuchsstoffinduzierte Blühhemmung bei Langtagpflanzen. Biol. Zbl. **69**, 272—282 (1950).

—, u. L. Schlitt: Blühförderung durch Ultraviolettbestrahlung. Naturwissenschaften **38**, 564—565 (1951).

Fischer, A.: Über die papierchromatographische und papierelektrophoretische Trennung von Indolderivaten. Planta (Berl.) **43**, 288—314 (1954).

Gordon, S. A., and R. P. Weber: Colorimetric estimation of indole-acetic acid. Plant Physiol. **26**, 192—195 (1951).

— — Studies on the mechanism of phytohormone damage by ionizing radiation. I. The radiosensitivity of indole-acetic acid. Plant Physiol. **30**, 200—210 (1955).

Gregory, F. G., and E. C. D. Baptisté: Physiological studies in plant nutrition. V. Carbohydrate metabolism in relation to nutrient deficiency and to age in the leaves of barley. Ann. Botany **50**, 579—619 (1936).

Harder, R., u. H. v. Witsch: Wirkung von Photoperiodismus und Jarowisation auf die Blütenbildung von Kalanchoe Bloßfeldiana. Gartenbauwiss. **15**, 226—246 (1940).

Heinisch, O.: Zuckerrüben-Samenbau. Eine Anleitung für die Produktion und den Anbau von Stecklings- und Samenrüben sowie für die Herrichtung des Samens von Zuckerrüben. Berlin: Deutscher Bauernverlag 1948.

Jerschel, D., u. R. Müller: Papierchromatographie der β-Indolylessigsäure. Naturwissenschaften **38**, 561—562 (1951).

Kenten, R. H.: The oxidation of indolyl-3-acetic acid by waxpod bean root sap and peroxidase systems. Biochem. J. **59**, 110—121 (1955).

Klebs, G.: Über Probleme der Entwicklung. III. Biol. Zbl. **24**, 545—559 (1904).

— Über Variationen der Blüten. Jb. Bot. **42**, 155—320 (1906).

Kock, P. C. de, R. F. Hunter and I. R. Macdonald: A germination inhibitor from sugar-beet. J. exp. Bot. **4**, 272—282 (1953).

Laibach, F., u. F. Meyer: Über die Schwankungen des Auxingehaltes bei Zea mays und Helianthus annuus im Verlauf der Ontogenese. Senckenbergiana **17**, 73—86 (1935).

Lefèvre, J.: Observation sur la teneur de divers organes végétaux en acide-indol-3-acétique. C.R. Soc. Biol. (Paris) **130**, 225—227 (1939).

Linser, H.: Versuche zur chromatographischen Trennung pflanzlicher Wuchsstoffe. Planta (Berl.) **39**, 377—401 (1951).

—, H. Mayr u. F. Maschek: Papierchromatographie von zellstreckend wirksamen Indolkörpern aus Brassica-Arten. Planta (Berl.) **44**, 103—120 (1954).

LÜDECKE, H.: Einfluß der Ernährung auf das Schossen der Zuckerrübe. Dtsch. landw. Presse **65**, 115—116 (1938).

MARGARA, J.: Sur la dévernalisation de bourgeons de la tige chez des espèces du genre Beta. C.R. Acad. Sci. (Paris) **246**, 145—147 (1958).

MELCHERS, G.: Die Wirkung von Genen, tiefen Temperaturen und blühenden Pfropfpartnern auf die Blühreife von Hyoscyamus niger. Biol. Zbl. **57**, 568—614 (1937).

— Die Blühhormone. Ber. dtsch. bot. Ges. **57**, 29—48 (1939).

MELCHIOR, G. H.: Über den Abbau von Indolderivaten. I. Mitteilung. Photolyse durch ultraviolettes Licht. Planta (Berl.) **50**, 262—290 (1957).

MOEWUS, F.: Der Kressewurzeltest, ein neuer quantitativer Wuchsstofftest. Biol. Zbl. **68**, 118—140 (1949).

SACHS, J.: Über den Einfluß des Tageslichtes auf Neubildung und Entfaltung verschiedener Pflanzenorgane. Bot. Ztg **21**, Beilage (1863).

SCHNEIDER, F.: Die Züchtung von Winter-Zuckerrüben. Z. Zuckerrübenbau **17**, 125—130 (1935).

SCHNEIDER, G., u. G. SPARMANN: Über ein Verfahren zur Durchführung der Papier-Hochspannungselektrophorese ohne Kühlung. Naturwissenschaften **42**, 156 (1955a).

SENDEN, H. v.: Untersuchungen über den Einfluß von Heteroauxin und anderen Faktoren auf die Blütenbildung bei der Kurztagpflanze Kalanchoe. Biol. Zbl. **70**, 537—565 (1951).

SPARMANN, G.: Morphologische und biochemische Untersuchungen an vernalisierten und nichtvernalisierten Gerstenpflanzen. Diss. Gießen 1958.

—, u. G. SCHNEIDER: Die Anwendung der Ultrafiltration zur Fraktionierung von Pflanzenpreßsäften und -extrakten. Naturwissenschaften **42**, 298 (1955).

STOKES, P., u. K. VERKERK: Flower formation in brussels sprouts. Meded. Landbouwhoogeschool Wageningen **50**, 141—160 (1951).

TANG, Y. W., and J. BONNER: The enzymatic inactivation of indole-acetic acid. I. Some characteristics of the enzyme contained in pea seedlings. Arch. Biochem. **13**, 11—25 (1947).

— — The enzymatic inactivation of indole acetic acid. II. The physiology of the enzyme. Amer. J. Bot. **35**, 570—578 (1948).

* TOLMAČEV, M. I.: Proc. URSS. Congr. Genetics **3**, 539 (1929).

VLITOS, A. W., and W. MEUDT: The role of auxin in plant flowering. I. A quantitative method based on paper chromatography for the determination of indole compounds and of 3-indole-acetic acid in plant tissues. Contr. Boyce Thompson Inst. **17**, 197—202 (1953).

VOSS, J.: Experimentelle Auslösung des Schossens und Prüfung der Schoßneigung der Rübensorten (Beta vulgaris L.) Angew. Bot. **18**, 370—407 (1936).

WAARD, J. DE, u. J. W. H. ROODENBURG: Premature flowerbud initiation in tomato seedlings caused by Tiba. Proc. kon. ned. Akad. Wet. **51**, 248—251 (1948).

WAGENKNECHT, A. C., and R. H. BURRIS: Indole-acetic acid inactivation enzymes from bean roots and pea seedlings. Arch. Biochem. **25**, 30—53 (1950).

YAMAKI, T., and K. NAKAMURA: Formation of indole-acetic acid in maize embryo. Sci. Pap. Coll. Cen. Educ. Univ. Tokyo **2**, 81—98 (1952).

Von den durch * gekennzeichneten Arbeiten standen mir lediglich Referate zur Verfügung.

Dr. G. SCHNEIDER,
Köln-Lindenthal, Institut für medizin. Isotopenforschung
Kerpenerstr. 15

Planta 55, 687—707 (1960)

Aus dem Staatsinstitut für Allgemeine Botanik, Hamburg

ÜBER EINE MESOCHIMÄRE AUS *SOLANUM NIGRUM* L. UND *LYCOPERSICON PIMPINELLIFOLIUM* MILL.*

Von

FRANZ BRABEC

Mit 10 Textabbildungen

(Eingegangen am 2. September 1960)

Einleitung und Problematik

Vor einigen Jahren ist kurz über eine Chimäre aus *Solanum nigrum* L. und *Lycopersicon pimpinellifolium* MILL. berichtet worden, an der eine damals nicht ganz verständliche Umwandlung erfolgt war (BRABEC 1955). Ihrer morphologischen Erscheinung nach wurde diese Pflanze für eine diplochlamyde Chimäre vom Typus eines *Solanum Gaertnerianum* n. WINKLER (1909) mit 2 Nachtschattentunicaschichten über einem Tomatenendosoma gehalten. Von den aus einer solchen Chimäre zu erwartenden Rückschlägen zu den beiden Komponenten ist bis 1955 nur der Nachtschattenrückschlag aufgetreten, der sich als tetraploid erwies. Seitdem ist auch der Tomatenrückschlag, diploid, wenn auch seltener, aufgetreten. Außerdem ist häufig ein Übergang in eine haplochlamyde Chimäre mit Nachtschattenepidermis über Tomatenendosoma zu verzeichnen.

Soweit waren die gefundenen Veränderungen mit dem ursprünglich angenommenen Aufbau einer Diektochimäre nach der Formel SSLL... (S = *Solanum*, L = *Lycopersicon*) in Einklang zu bringen. Nun fand sich aber außerdem eine Umwandlung in eine Chimäre, die ihrer Morphologie nach und auf Grund von histologischen Untersuchungen zweifelsfrei als diplochlamyd mit 2 Tomatentunicaschichten über Nachtschattenendosoma (*S. proteus* n. WINKLER) anzusprechen war (Abb. 1). Die an dieser neuen Chimäre in einigem Umfang entstehenden Samen sowie die aus Tomatenrückschlägen reichlich gewonnenen Samen lieferten stets reines diploides *L. pimpinellifolium*. Diese Befunde waren als Bestätigung des Aufbaues dieser Chimäre nach der Formel LLSS... anzusehen. Für die Umwandlung einer Chimäre der Formel SSLL... in eine solche der Formel LLSS... konnte zunächst keine Erklärung gefunden werden, es sei denn, man würde eine völlige Umschichtung am Vegetationspunkt annehmen, die mit den geltenden Vorstellungen über dessen Aufbau und

* Unter Verwendung eines Beitrags zu einer Herrn Professor Dr. W. MEVIUS zum 65. Geburtstag gewidmeten Festschrift.

Entwicklungsmechanik nicht in Einklang zu bringen wäre. In Tabelle 1 sind die gefundenen Umwandlungen zusammengestellt.

Die Tabelle gibt jedoch nicht ganz das richtige Häufigkeitsverhältnis der Umwandlungen wieder, da sie auf zu willkürlichen Zeitpunkten vor-

Abb. 1. Die Mesochimäre 53 mit der Umwandlung in die diplochlamyde LLSS...-Chimäre. Die Pfeile bezeichnen den Stengelabschnitt, in dem sich die Umwandlung vollzogen hat. Der nach oben links abgehende Seitensproß hat noch den Charakter der Mesochimäre. Der nach unten herabhängende Sproß ist vollständig umgewandelt. Die Pfeile rechts oben und unten bezeichnen Früchte der Mesochimäre. Etwa $^1/_2$ nat. Größe. (Photo Dr. KALDEWEY)

genommenen Zählungen beruht. Sie läßt jedoch die auffällige Häufigkeit der Umwandlungen zu *L.p.* + *S.n.* I erkennen. In der Reihenfolge der Häufigkeiten folgt der Rückschlag zu *S.n.*, der nicht selten auftritt. Dann folgen die Rückschläge zu *L.p.* Die in der Tabelle verzeichneten Fälle sind die einzigen bisher beobachteten. An letzter Stelle erscheint die Umwandlung zu *S.n.* + *L.p.* II, die seit Entstehung der Ausgangschimäre nur einmal beobachtet wurde.

Tabelle 1

Chimäre 53

L.p. + *S.n.* (4n) I	*S.n.* + *L.p.* II	*S.n.* (4n)	*L.p.*[1]
(SLLL . .)	(LLSS . .)	(SSSS . .)	(LLLL . .)
57	1	4	2

[1] Hier und im folgenden werden die Artnamen durch Symbole wiedergegeben, *S.n.* = *Solanum nigrum*, *L.p.* = *Lycopersicon pimpinellifolium*. Die Chimären sind mit der von WINKLER (1908) eingeführten Schreibweise bezeichnet. Aus den daruntergesetzten Formeln ist der histologische Aufbau des Vegetationspunktes ersichtlich.

Material und Methode

Anfangs wurde die Chimäre 53 in Töpfen in Erde kultiviert und laufend durch Stecklinge vermehrt. Später erwies sich die Hydrokultur in Bimskies als zweckmäßiger. Stecklinge wurden in Mitscherlich-Töpfen in feinkörnigen Bimskies gesetzt, der von unten durch einen angelöteten Stutzen mit Gummischlauch mit Nährlösung (NUERNBERGK 1955) durchtränkt werden konnte. Eine auf den Mitscherlich-Topf gesetzte Plexiglashaube diente als Verdunstungsschutz. Nach 14 Tagen war meist eine ausreichende Bewurzelung erzielt. Die Stecklinge wurden dann zunächst in kleinen Töpfen in Bimskies mit Nährlösung weiterkultiviert und nach einiger Zeit in ein Hydroponikbeet des Versuchsgewächshauses des Instituts umgepflanzt. Durch eine Pumpanlage kann das Beet aus einem im Keller des Gewächshauses gelegenen Vorratsbehälter mit Nährlösung versorgt werden. Die Versorgung der Pflanzen ist dadurch sehr vereinfacht und Wachstum und Entwicklung können als optimal angesehen werden.

Für die histologische Untersuchung wurden Sproßspitzen in Craf fixiert, nach Paraffineinbettung mit dem Mikrotom in 15—20μ dicke Schnitte zerlegt und nach der Gentianaviolettmethode gefärbt (JOHANSEN 1950). Anatomische Untersuchungen wurden an Freihandschnitten und abgezogenen Epidermen durchgeführt. Zeichnungen wurden mit Hilfe eines Zeichenaufsatzes von Zeiss-Winkel hergestellt. Spaltöffnungs- und Zellenmessungen konnten nach vorheriger Zeichnung mit einem Planimeter von Dennert und Pape, Hamburg, ausgeführt werden. Mikrophotographien sind teils mit der Contax und einem Mikrophotoaufsatz von Zeiss, teils mit einem Zeiss-Cameramikroskop ausgeführt worden.

Weitere methodische Angaben zu spezielleren Untersuchungen, wie der Pollenkeimung, finden sich im Text.

Ergebnisse

Die histologische Untersuchung der Chimäre 53 hat eine völlig zufriedenstellende und alle Vorgänge erklärende Deutung gebracht. Die Ausgangschimäre ist nicht, wie ursprünglich angenommen, eine diplochlamyde, sondern eine Mesochimäre mit Nachtschattendermatogen und Tomatenhypodermale über einem Nachtschattenendosoma (Abb. 3). Man muß ihr also die Formel SLSS... zuordnen. Ein solcher Chimärenaufbau war auf Grund seiner histologischen Untersuchungen an den Winklerschen *Solanum*chimären und daran angeschlossene theoretische

Überlegungen von LANGE (1926) als möglich angesehen worden. WINKLER hatte, einer Bemerkung von LANGE (S. 278) zufolge, eine solche Chimäre

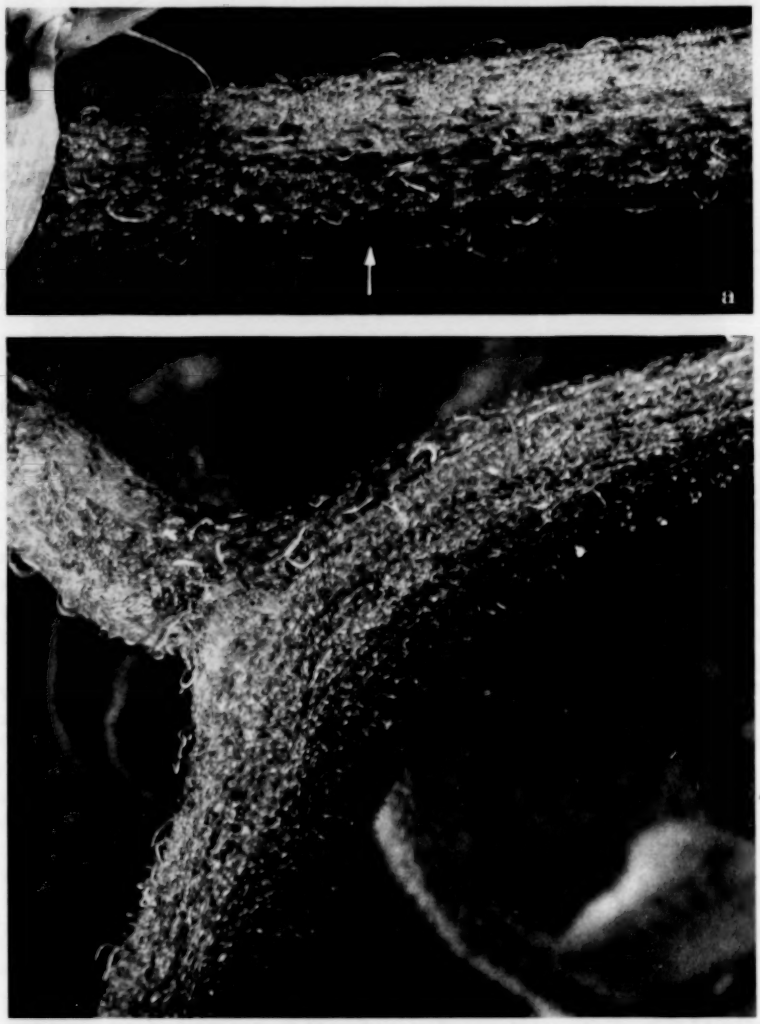


Abb. 2a u. b. Zwei Ausschnitte aus dem in Abb. 1 bezeichneten Stengelabschnitt, Beginn und Ende der Umwandlung veranschaulichend. Bei a rechts noch völlig die für *S. n.* typische grobe, spärliche Behaarung. Links unten ein schmaler Streifen mit feiner, dichterer Tomatenbehaarung. Bei b bereits fast der ganze Stengel mit der feinen, dichten, mit Drüsenhaaren vermischten Tomatenbehaarung besetzt. Nur auf der Oberseite noch ein Streifen mit Nachtschattenbehaarung. Oben links ein Seitensproß, der noch vollständig den Mesochimärencharakter zeigt. Vergr. etwa 10fach. (Photo Dr. KALDEWEY)

„vermutlich hergestellt und in Kultur". Es ist aber niemals eine Veröffentlichung darüber erfolgt. Später ist es SATINA und BLAKESLEE

(1940) gelungen, mit der Colchicinmethode bei *Datura stramonium* chromosomale Mesochimären (z. B. 2n—4n—2n...) zu erhalten. Auch sind Panaschüre-Mesochimären bekannt (Renner 1936a, b; Bergann und Bergann 1959). Der hier mitgeteilte Befund dürfte aber der erste genauer beschriebene über eine Mesochimäre aus artverschiedenen Komponenten sein.

Der Schichtenaufbau der Chimäre wird besonders verdeutlicht durch die Tetraploidie der Nachtschattenkomponente. Dadurch sind die ohnehin schon gegebenen Zell- und Kerngrößenunterschiede zwischen Tomate und Nachtschatten (Lange 1926) noch so gesteigert, daß die Herkunft der Zellen und Gewebe auch bei weit fortgeschrittener Differenzierung kaum Zweifel aufkommen läßt. In jungen Achselsprossen, Blattanlagen und jungen, in Differenzierung begriffenen Blättern, Stengellängs- und -querschnitten sowie Blütenanlagen konnte überall die kleinzellige L II aus L.p.-Zellen ohne Schwierigkeiten erkannt und ihre weitere Entwicklung verfolgt werden (Abb. 3). Ohne genaueren histogenetischen Untersuchungen vorzugreifen, kann schon jetzt festgestellt werden, daß in jungen Stengeln die L II ein zunächst einschichtig bleibendes Hypoderm bildet, daß in Blattanlagen frühzeitig in der Blattspitze perikline L II-Spaltungen stattfinden, so daß das Mesophyll der Blattspitze ausschließlich aus L. p.-Zellen besteht. In den Blütenanlagen konnte die Einleitung der Entwicklung von Kelch- und Kronblättern durch perikline Spaltungen in L II beobachtet werden (Abb. 3e, f, g). Das alles entspricht in großen Zügen dem Entwicklungsablauf, wie er von Lange (1926) an den Winklerschen *Solanum*chimären und von Satina und Blakeslee (1940, 1943) an *Datura* festgestellt wurde. Die Entwicklungsvorgänge im einzelnen genauer darzustellen, wird Aufgabe speziellerer Untersuchungen sein müssen.

Die Mesochimäre hat aufrechten Wuchs und ähnelt im Habitus dem Nachtschatten (Abb. 4). Sie ist unregelmäßig verzweigt, dabei gelegentlich nach Art einer „Scheindichotomie", wobei das Tragblatt des Achselsprosses mit diesem mehr oder weniger weit in die Höhe gewachsen ist (Winkler 1938, Brabec 1954). Die Epidermis hat nach Zellgröße und Behaarung typischen Nachtschattencharakter. Das Blatt ist unregelmäßig gezähnt und eingeschnitten bis zur ausgeprägten Fiederschnittigkeit. Es zeigt darin einige Ähnlichkeit mit der Morphologie des Blattes von *S. n.* + *L. p.* II, ist jedoch weniger regelmäßig. Manche Blätter sind auch wieder fast ganzrandig und nur wenig gezähnt. Eine Ähnlichkeit mit dem Winklerschen *S. Gaertnerianum* (*L. esculentum* + *S. n.* II) kommt in der häufigen Spreitenwölbung und Einkrümmung des Blattrandes zum Ausdruck. Diese Beschaffenheit, zusammen mit den Epidermismerkmalen und der Blütenmorphologie, war maßgeblich für die erste falsche Beurteilung der Pflanze. Der Breitenindex des Blattes

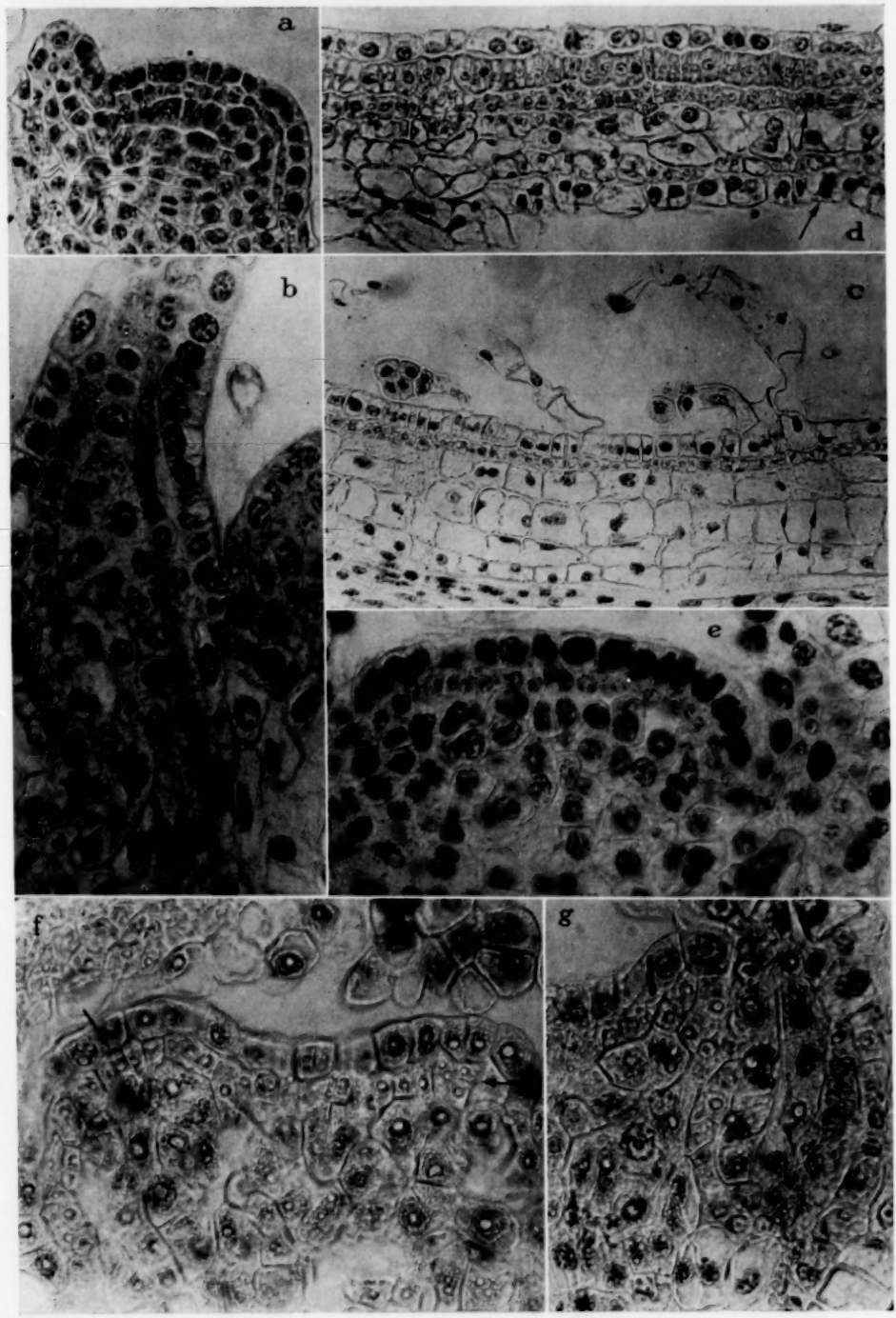


Abb. 3 (Legende nebenstehend)

(Breite : Länge × 100) läßt unschwer die Tetraploidie der Nachtschattenkomponente erkennen: Chimäre 53 : 80,2 ± 1,9; S.n.(4n): 75,0 ± 1,4; S.n.(2n) : 58,1 ± 1,0. Der Breitenindex der Chimäre liegt sogar noch etwas über dem des tetraploiden Nachtschattens. Die Tetraploidie der Blattepidermis ist auch an den Spaltöffnungsgrößen zu erkennen: Chimäre 53 : 1189 ± 25 μ^2; *S.n.*(4n)-Rückschlag: 1416 ± 67 μ^2; *S.n.*(4n)-Sämling: 1435 ± 55 μ^2. Die Vergleichswerte für *S.n.*(2n) und *L.p.*(2n) sind: 690 ± 8,0 μ^2 und 438 ± 3,7 μ^2 (Braßec 1954). Die Übereinstimmung der Werte von *S.n.*(4n)-Sämlingspflanzen und -Rückschlägen ist augenfällig. Dagegen ist der Chimärenwert merklich kleiner und selbst bei der verhältnismäßig geringen Zahl von Messungen (50 je Pflanzentyp) statistisch gesichert verschieden von dem Mittel der beiden anderen Werte ($P < 0{,}001$, Pätau 1943). Die weitere Verfolgung dieser Frage wird vielleicht Rückschlüsse auf die Stoffwechselbeziehungen zwischen den Chimärenkomponenten gestatten. Die zum Vergleich aufgeführten Werte für *S.n.*(2n) und *L.p.*(2n) machen hinlänglich klar, daß der Chimärenwert durchaus der Größenordnung von *S.n.*(4n) angehört. Die Tetraploidie der *S.n.*-Komponente ist überdies durch karyologische Befunde an der Chimäre, den daraus hervorgegangenen *S.n.*-Rückschlägen, sowie den aus letzteren gewonnenen Sämlingen gesichert. Wurzelspitzenmitosen aller drei Pflanzentypen sowie auf *S.n.* zurückzuführendes Gewebe der Chimäre (Epidermis, innere Mesophyllzellen, inneres Stengelgewebe) ließen an auszählbaren oder wenigstens schätzbaren Mitosen die für tetraploides *S.n.* zu erwartende Chromosomenzahl $4n = \pm 144$ erkennen.

An der Blattmorphologie ist noch bemerkenswert, daß die Randpartien teilweise etwas heller grün sein können als die inneren Bereiche der Blattspreite. Dieser Unterschied zwischen den beiden Bereichen des Blattes ist aber durchaus nicht immer deutlich. Vor allem bei jungen Blättern von in gutem Kulturzustand befindlichen Pflanzen ist kaum etwas davon zu erkennen. Mit zunehmendem Alter aber, insbesondere bei beginnender Welke wird der Farbunterschied immer deutlicher. Bei einem mittleren Welkegrad ist dann der Blattrand bereits vergilbt, während die innere Blattspreite noch frisch grün erscheint. Die Grenze zwischen beiden Zonen ist scharf und verläuft unregelmäßig. Die gelben

Abb. 3a—g. Chimäre 53. a Junger Achselsproß mit Blattanlage. Vergr. etwa 210fach. b Etwas ältere Blattanlage im medianen Längsschnitt. L II auf beiden Seiten noch einschichtig, dagegen in der Blattspitze Aufspaltung. Vergr. etwa 280fach. c Stengel, längs. Epidermis mit für *S.n.* typischer Behaarung. Darunter das kleinzellige *L.p.*-Hypoderm. Vergr. etwa 130fach. d Blatt, längs. Differenzierung des Palisadenparenchyms. Vermutlich randständiger Schnitt, der Beteiligung von L II am Schwammparenchym zeigt; mittleres Mesophyll aus L III, unterste Schwammparenchymschicht wieder aus L II. Man beachte die Mitosefiguren in der Epidermis und im oberen Schwammparenchym. Vergr. etwa 165fach. e Blütenanlage, längs, die großkernige L I und L III und die kleinkernige L II zeigend. Vergr. etwa 280fach. f Blütenanlage, längs. Perikline Spaltungen in L II zur Anlage der Kronblätter. Vergr. etwa 320fach. g Blütenanlage, längs. Etwas ältere Kronblattanlage, Spaltung in L II zeigend. Gewebezapfen aus L III in die Basis der Anlage eintretend. Mitose in der großkernigen Epidermis. Vergr. etwa 320fach

Blattrandzonen können z.T. tief in die Blattspreite hineinschneiden, sie gelegentlich sogar in durch Brücken gelben Gewebes getrennte Inseln aufspalten. Diese grünen Inseln sind meist etwas beulig aufgetrieben. Zudem sind die gelben Randzonen noch oft mehr oder weniger blau überlaufen. Die anatomische Untersuchung der Blätter gab Aufschluß über

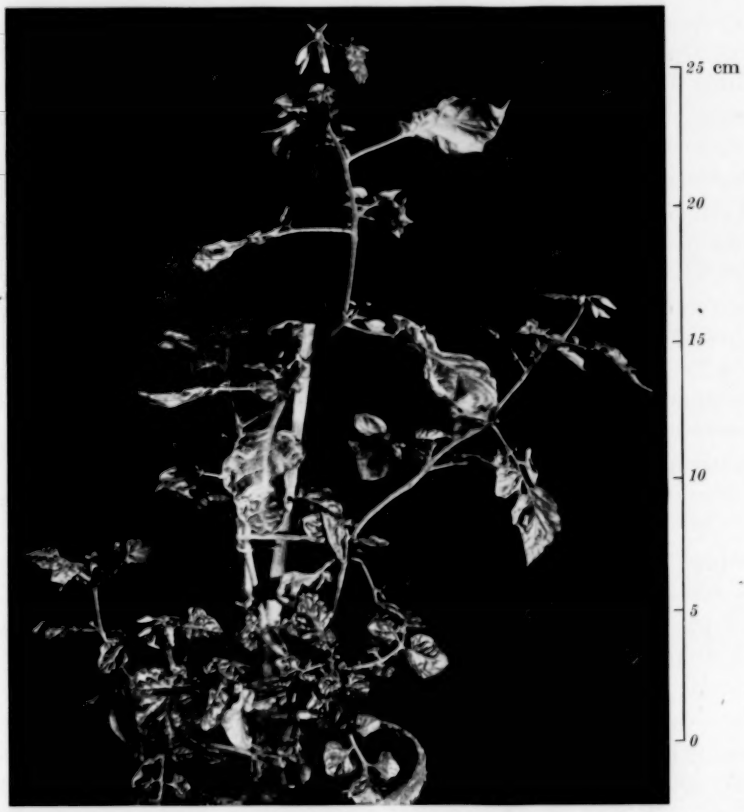


Abb. 4. Habitus der Mesochimäre. Etwa $^1/_3$ nat. Größe. Die Maßstabseinheit beträgt 5 cm. (Photo Dr. KALDEWEY)

die Ursache dieser Zonierung. Unter der oberen Epidermis findet man über die ganze Blattspreite durchlaufend eine verhältnismäßig kurzzellige Palisadenschicht aus *L.p.*-Zellen. Diese sind deutlich kleiner als normale *L.p.*-Zellen, was auf Behinderungen im Stoffwechsel zwischen den Chimärenpartnern hindeuten mag. Die Vergilbung ist auf Chlorophyllabbau ausschließlich in den *L.p.*-Zellen zurückzuführen. In den zuerst vergilbenden Randzonen folgt auf das Palisadenparenchym ein kleinzelliges Schwammparenchym, dessen oberste Schicht einen Flächenwert (Mittel aus 20 Messungen) von $1047 \pm 163\,\mu^2$ aufweist (Abb. 5).

Dieser Wert ist zwar kleiner als der entsprechende für *L.p.*: $1370 \pm 108\,\mu^2$, aber nicht gesichert davon verschieden (P = 0,1). In den mittleren, länger grün bleibenden Bereichen der Spreite findet man dagegen unter den Palisaden eine sehr großzellige oberste Schwammparenchymschicht, deren mittlerer Flächenwert $3570 \pm 287\ \mu^2$ mit dem von entsprechenden Zellen aus *S.n.*-Rückschlägen übereinstimmt: $3875 \pm 294\ \mu^2$ (P = 0,52) (Abb. 6). Daraus ergibt sich, daß in den Randzonen das Mesophyll ausschließlich aus *L.p.*-Zellen besteht. Das ist offenbar auf perikline Spaltungen in L II zurückzuführen. Die inneren Teile der Spreite dagegen enthalten wenigstens eine (obere) Schwammparenchymschicht aus großen *S.n.*-Zellen. Die unteren Schwammparenchymschichten sind wieder kleinzelliges *L.p.*-Gewebe. Die Vergilbung ist nun ausschließlich auf Chlorophyllabbau in den *L.p.*-Zellen zurückzuführen. Dabei sind sowohl die das gesamte Mesophyll der Randzonen aufbauenden *L.p.*-Zellen vergilbt als auch diejenigen, die in den mittleren, noch grünen Spreitenpartien das großzellige *S.n.*-Mesophyll oben und unten bedecken. Diese Spreitenteile sind also noch grün lediglich durch die grün gebliebenen großzelligen *S.n.*-Schwammparenchymzellen.

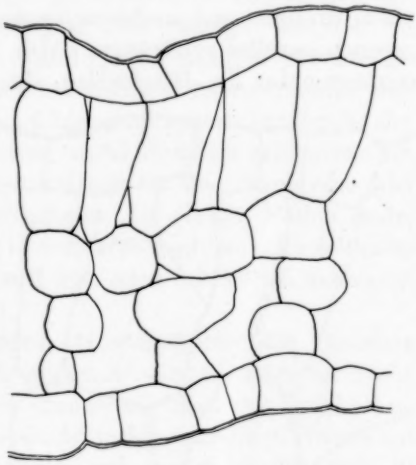


Abb. 5. Mesochimäre 53. Blattrandzone, Querschnitt. Kleinzelliges *L.p.*-Schwammparenchym. Vergr. etwa 330fach

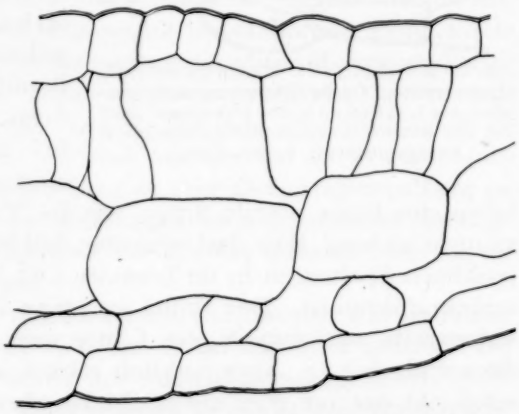


Abb. 6. Mesochimäre 53. Blatt, Querschnitt, Spreitenmitte. Großzellige obere Schwammparenchymschicht. Vergr. 330fach

Ebenso wie durch perikline Spaltungen in L II das aus L III stammende *S.n.*-Gewebe aus den Blattrandzonen verdrängt wird, kann nun auch im Bereich der Spreitenmitte durch Spaltung der *S.n.*-Zellen das

L.p.-Gewebe mehr oder weniger beiseitegedrängt werden. So können meist allerdings begrenzte Zonen gefunden werden, in denen großzellige *S.n.*-Schwammparenchymzellen sich nach oben zwischen die *L.p.*-Palisaden drängen und andererseits auch nach unten die *L.p.*-Schwammparenchymzellen verdrängen (Abb. 7). Das Ergebnis ist dann ein lokal engbegrenzter *S.n.*-Rückschlag, der natürlich in der allgemeinen Blattmorphologie nicht in Erscheinung treten kann und auch zu keiner normalen Blattanatomie führt, da keine Palisaden ausgebildet werden. Man kann das Ergebnis wohl als ungeordnetes Wachstum schon als Schwammparenchym determinierter Zellen werten.

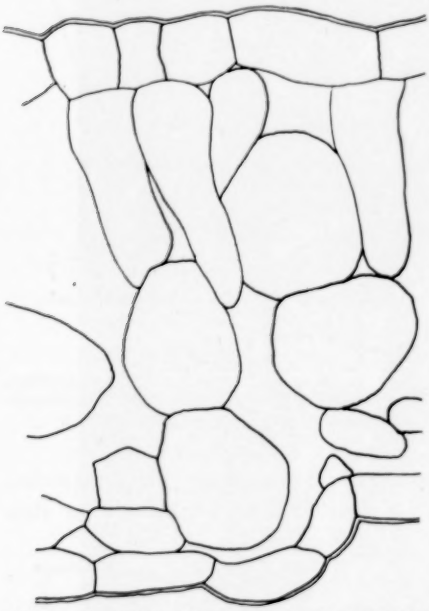


Abb. 7. Mesochimäre 53. Blatt, Querschnitt, Spreitenmitte. Große Schwammparenchymzellen aus L III (*S.n.*) in die Palisadenschicht und die untere Schwammparenchymschicht hineinwuchernd. Vergr. 330fach

Die Blütentrauben sind nach Aufbau und Anzahl der Blüten denen von *S.n.* ähnlich. Auch die Einzelblüte ist der Nachtschattenblüte sehr ähnlich. Der Kelch ist beschaffen wie bei *S.n.*, die Kelchzipfel sind kurz und breit wie bei *S.n.*(4n). Die Behaarung ist grob wie bei *S.n.*(4n). Auch die Krone ist wie bei *S.n.* beschaffen, nur enthalten die Kronzipfel einen gelben Mittelstreifen, der auf die Beteiligung von *L.p.*-Zellen hinweist. Die Staubblätter stehen frei wie bei *S.n.*, aber sie sind etwas länger und spitzer. Sie haben eine kurze, sterile Spitze wie die Tomatenstaubblätter, nur ist sie nicht so lang. Man darf vermuten, daß ihre Bildung auf frühzeitigen periklinen Spaltungen in der Tomaten-L II bei Anlage der Staubblätter zurückzuführen ist. Der Griffel ist etwas länger als bei *S.n.* und hat andererseits nur etwa $^2/_3$ der Länge von *L.p.*-Griffeln. Er ist etwas dünner als bei *S.n.*, aber merklich stärker als bei *L.p.* Die Behaarung entspricht der von *S.n.* und reicht bis über die Mitte hinauf [bei *S.n.* (2n) und (4n) bis etwa zur Mitte]. Die Narbe ist etwas kleiner als bei *S.n.* Der Fruchtknoten ist in der Größe etwa intermediär zwischen *L.p.* und *S.n.*, etwa dreimal so groß wie bei *L.p.*, ca. $^1/_3$ der Größe von *S.n.*(2n) und ca. $^1/_4$ der Größe von *S.n.*(4n).

Fruchtbildung ist nicht gerade häufig. Die meisten Blüten fallen ab, ohne eine Frucht gebildet zu haben. Von den Frucht ansetzenden Blüten

entwickeln sich auch nur wenige weiter und erlangen einen Durchmesser von 5—6 mm (Abb. 1). Der vertrocknete Griffel bleibt meist bis zur Reife an der Frucht sitzen. Die Form der Früchte ist teils kugelig wie bei den Nachtschattenbeeren, teils mehr oder weniger länglich bis pflaumenförmig. Werden einmal in einer Traube mehrere Früchte gebildet, so kann man die verschiedensten Formen nebeneinander vorfinden. Die Farbe der Früchte ist meist blau-schwarz wie bei der Nachtschattenbeere, teils aber auch blau-rot, wobei deutlich erkennbar ist, daß die rote Farbe im Fruchtfleisch lokalisiert ist und durch eine oder mehrere blaue Außenschichten durchscheint. In einigen Fällen findet man auch eine sektoriale Gliederung in schwarze und rote oder schwarze und schwarzrote oder schwarzrote und rote oder schließlich schwarze, schwarzrote und reinrote Abschnitte.

Einige Einzelbeschreibungen mögen Aufschluß über die Ursachen dieser Mannigfaltigkeit geben. Bei einer Frucht von schwarzroter Farbe wurde gefunden, daß die Epidermis charakteristische Nachtschattenstruktur hatte: geringe Wanddicke in der Mitte der antiklinen Wände mit Tüpfelkanälen darin, die Membranstärke nach außen zunehmend, die Cuticula typisch gestreift, Epidermiszellen und hypodermale Zellen anthocyanhaltig. Soweit bestand Übereinstimmung mit der Beschaffenheit einer Nachtschattenfrucht mit der bemerkenswerten Einschränkung, daß die Anthocyankonzentration in den Epidermiszellen der echten Nachtschattenbeere erheblich geringer war als in den Epidermiszellen der Chimärenfrucht. Das übrige Fruchtfleisch der Chimärenfrucht enthielt in den äußeren Schichten lange, nadel- bis tafelförmige bläulich-rote Kristalle (offenbar Lycopin), in den inneren Schichten überwiegend gelbe bis ziegelrote kleinkristalline Chromatophoren (wohl teils Carotin, teils Lycopin enthaltend; Lehmann 1955). Dadurch ist es hinlänglich als Tomatengewebe ausgewiesen. Es muß also hier bei der Fruchtbildung oder schon bei der Fruchtblattbildung zu einer Dermatogenspaltung gekommen sein, die zu einem zweischichtigen Nachtschattenektosoma geführt hat. Das übrige Fruchtfleisch ist offenbar ausschließlich aus der Tomaten-L II hervorgegangen.

Bei einer zweiten Frucht von etwa 5 mm Durchmesser war ein Sektor von etwa $^1/_3$ des Umfangs schwarz, das übrige dunkelrot gefärbt. Der schwarze Sektor hatte eine matte, der dunkelrote eine glänzende Oberfläche. Die mikroskopische Untersuchung an einem abgezogenen Epidermisstück aus dem Grenzbereich beider Sektoren zeigte, daß im schwarzen Sektor die Cuticula die charakteristische Streifung des Nachtschattens aufwies. Gegen den dunkelroten Sektor hin nahm die Streifung ab, um schließlich ganz zu verschwinden oder hier und da nur noch schwach in Erscheinung zu treten. Die Zellen waren nach Form, Größe, Beschaffenheit der antiklinen Wände und Tüpfelung in beiden Sektoren

Nachtschattenzellen. Der Querschnitt durch den dunkelroten Sektor ergab, daß im wesentlichen nur die Epidermis, vereinzelt auch mal eine hypodermale Zelle Anthocyan enthielt. Anthocyanhaltige hypodermale Zellen waren stets frei von Carotinoiden. Im übrigen war das Fruchtfleisch carotinoidhaltig und frei von Anthocyan. Im schwarzen Sektor war die Situation überraschenderweise genau so, nur mit stärkerer Anthocyankonzentration in den Epidermiszellen und mit der typischen cuticulären Streifung derselben. Insgesamt handelt es sich also um eine Tomatenfrucht mit Nachtschattenepidermis, wobei vereinzelt durch perikline Dermatogenspaltungen auch Nachtschattenzellen an das Fruchtfleisch abgegeben werden können. Bei solchen Früchten ist also ein Übergang zu einer *L.p.* + *S.n.* I-Chimäre (SLLL...) erfolgt. Unklar bleibt dabei die sektoriale Änderung der Epidermisstruktur. Man könnte an eine somatische Mutation im Dermatogen denken, die dann zugleich die Anthocyankonzentration oder die Zellsaftacidität und die Beschaffenheit der Cuticula verändert haben müßte. Überdies müßte sie schon sehr früh, sicherlich vor Bildung der Blütenanlage aufgetreten sein.

In einem dritten Fall waren der schichtweise Aufbau sowie Rückschläge und Umwandlungen in andere Chimärentypen aus der Anatomie deutlich abzulesen. Die genannte Frucht hatte eine Länge von 10 mm und einen Durchmesser von etwa 8 mm. Etwas weniger als die Hälfte des Umfangs war schwarz, der Rest rot. Vom roten Sektor war aber etwa $^1/_3$ schwarzrot. Dieser schwarzrote war auf der einen Seite vom schwarzen Sektor durch einen etwa 1 mm breiten rein roten Streifen getrennt. Der schwarze und der gesamte rote + schwarzrote Sektor waren durch eine Scheidewand voneinander getrennt, die ganze Frucht war also zweifächerig. Im schwarzen Sektor war das ganze, das Fruchtfach völlig ausfüllende Fruchtfleisch blau wie bei der Nachtschattenbeere. Die Placenta war nicht entwickelt. An der Scheidewand fand sich nur ein etwas excentrisch gelegener, von totem Gewebe umgebener Hohlraum. Von Samen war keine Spur zu finden. Im gesamten roten Sektor war das ebenfalls das Fruchtfach nahezu ganz ausfüllende Fruchtfleisch rot. Einige nicht voll entwickelte Samen wurden hier vorgefunden; sie waren nicht keimfähig.

Die mikroskopische Untersuchung der Fruchtepidermis zeigte, daß die Epidermis im rein roten und im schwarzen Sektor die gleiche war, nämlich die von *L.p.* Das Nachtschattenfruchtfleisch des schwarzen Sektors ist also von einer *L.p.*-Epidermis überdeckt. Der rein rote Sektor besteht von der Epidermis bis zur Placenta aus reinem Tomatengewebe, stellt also einen völligen Rückschlag zur Tomatenkomponente dar. Im schwarzroten Sektor dagegen ist das rote Tomatenfruchtfleisch von einer anthocyanhaltigen, daher blauen Nachtschattenepidermis überdeckt (Abb. 8). Bemerkenswerterweise fehlten dieser die sonst für die Frucht-

epidermis von *S.n.* charakteristischen Cuticularleisten. Hierzu ist noch zu bemerken, daß bei den Fruchtepidermiszellen von tetraploidem *S.n.* die cuticuläre Streifung wesentlich schwächer entwickelt ist als beim diploiden Nachtschatten. Bei den sonst für diese Chimäre typischen, rein schwarzen Beeren war dagegen die cuticuläre Streifung sehr ausgeprägt. Der Übergang von Tomatenepidermis zu Nachtschattenepidermis innerhalb des roten Sektors ist absolut scharf, ohne jeden Übergang, so daß beide Zelltypen unmittelbar nebeneinanderliegend gefunden werden (Abb. 9), ein Befund, der völlig übereinstimmt

Abb. 8

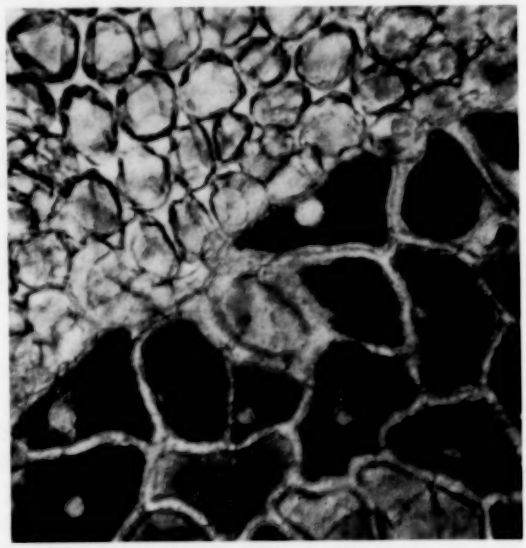


Abb. 9

Abb. 8. Schematischer Querschnitt durch eine Mesochimärenfrucht mit verschieden gefärbten Sektoren. Die Epidermis ist doppelkonturig und übertrieben stark dargestellt. Die schwarzgehaltenen Teile sind anthocyanhaltiges *S.n.*-Gewebe, die weißgelassenen sind *L.p.*-Gewebe. Einzelheiten s. Text. Etwa 4fach vergr.

Abb. 9. Mikrophotographie der Epidermis einer Mesochimärenfrucht mit verschieden gefärbten Sektoren (Abb. 8). Übergangsloses Nebeneinander von *S.n.*-Zellen (anthocyanhaltig) und *L.p.*-Zellen; nach einem Farbdiapositiv [1]

mit den später zu beschreibenden anatomischen Befunden im Bereich der Umwandlung zur *S.n.* + *L.p.* II-Chimäre (*S. proteus*-Typ).

In diesem zuletzt beschriebenen Fall muß der schwarze Sektor der Frucht durch Perforation der Nachtschatten-L I entstanden sein, wodurch die Tomaten-L II zum Dermatogen wurde und das gesamte Endosoma von *S.n.* geliefert wurde. Hier liegt also eine Umwandlung in eine *S.n.* + *L.p.* I-Chimäre (LSSS...) vor. Im schwarzroten Sektor ist durch L II-Spaltung ein reines Tomatenendosoma entstanden, das in diesem Sektor noch vom ursprünglichen *S.n.*-Dermatogen überdeckt war. So ist hier sektorial eine *L.p.* + *S.n.* I-Chimäre (SLLL...) entstanden. Im rein roten Sektor schließlich hat das *L.p.*-Endosoma auch noch die

[1] Interessenten kann auf Anforderung ein farbiger Papierabzug des originalen Diapositivs zugestellt werden.

S.n.-L I durchbrochen und einen vollständigen Tomatenrückschlag geliefert. So veranschaulicht diese eine Frucht zugleich drei verschiedene Umwandlungsschritte.

Bemerkenswert ist, daß die cuticuläre Streifung der Nachtschattenepidermen überall dort abgeschwächt ist oder fehlt, wo sie unmittelbar an Tomatengewebe grenzt, mit Ausnahme jedoch des schwarzen Sektors der an 2. Stelle beschriebenen Frucht . Die cuticuläre Streifung der Nachtschattenepidermis erweist sich jedenfalls als sehr variabel. Wieweit stoffwechselphysiologische oder wachstumsmechanische Ursachen dafür verantwortlich sind, ist vorerst nicht zu entscheiden. Eine spezifische Beeinflussung durch das benachbarte Tomatengewebe wird als Erklärungsmöglichkeit sowohl dadurch ausgeschaltet, daß bei tetraploidem Nachtschatten die Streifung ebenfalls stark abgeschwächt ist, als auch dadurch, daß im Fall der 2. Frucht gestreifte und ungestreifte Nachtschattenepidermis nebeneinander in gleicher Weise an Tomatengewebe angrenzen.

Samenbildung konnte bisher in keinem Fall erzielt werden. Die Untersuchung des Pollens ergab, daß zwar ein erheblicher Teil der Pollenkörner abortiert war, aber um 40% machten einen normalen Eindruck. Ein erster Bestäubungsversuch mit 5 *L.p.*-Blüten brachte aber keinen Erfolg. Daraufhin wurde die Keimfähigkeit des Pollens untersucht. Pollenproben von *L.p.*, der Chimäre und von *S.n.* wurden im hängenden Tropfen einer 15%igen Saccharoselösung + 0,01% Borsäure (LICHTE 1957) halbstündlich untersucht. Bei *L.p.*-Pollen setzte die Keimung nach etwa 30 min ein. Nach etwa 2 Std waren lange, schlanke Pollenschläuche ausgewachsen, die dann allerdings bereits an der Spitze aufzuplatzen begannen. Auch der überwiegende Teil des normal erscheinenden Pollens der Chimäre keimte nach etwa der gleichen Zeit und hatte nach 2 Std Pollenschläuche von ähnlicher Länge gebildet wie der normale *L.p.*-Pollen. Auch hier begannen die Schläuche dann zu platzen. *S.n.*-Pollen keimte unter den gegebenen Bedingungen nur zu einem geringen Teil aus und bildete nur kurze, dick aufgetriebene Schläuche, deren Wachstum bald zum Stillstand kam. Der keimfähige Teil des Chimärenpollens verhielt sich also in diesem Test genauso wie der *L.p.*-Pollen, mit dem er ja herkunftsmäßig auch übereinstimmen mußte. Ein erneuter Bestäubungsversuch mit insgesamt 15 *L.p.*-Blüten schlug aber wieder völlig fehl. Der Chimärenpollen ist also zwar keimfähig, aber offenbar nicht befruchtungsfähig. Diesem interessanten Problem soll weiter nachgegangen werden.

Besprechung der Ergebnisse

Die gefundenen Rückschläge und Umwandlungen sind nun also folgendermaßen zu verstehen (vgl. Tabelle 2). Aus der ursprünglichen

Tabelle 2. *Umwandlungsmöglichkeiten der Mesochimäre*

SLSS . .	SSLS . . ----> SSLL . . (Spaltung in L I)	L.*p.* + *S.n.* II = *S. Gaertnerianum*-Typ
	SLLS . . ----> SLLL . . (Spaltung in L II)	*L.p.* + *S.n.* I = *S. Koelreuterianum*-Typ
	LSSS . . (Perforation von L I)	*S.n.* + *L.p.* I = *S. tubingense*-Typ
	LLSS . . (Spaltung in L II und Perforation von L I)	*S.n.* + *L.p.* II = *S. proteus*-Typ
	LLLL . . (mehrfache Spaltung in L II und Perforation von L I)	L.p.
	SSSS . . (Perforation von L I und L II oder nur Perforation von L II oder Vervielfachung in L I)	S.n.

Mesochimäre (SLSS...) kann leicht ein Rückschlag zu *S.n.* entstehen, wenn das Nachtschattenendosoma die beiden äußeren Tunicaschichten oder wenigstens das Tomatenmesosoma durchbricht. Dabei scheint der letztgenannte Vorgang am wahrscheinlichsten und am ehesten zum genannten Ergebnis zu führen. Einige histologische Bilder weisen auch tatsächlich darauf hin. Denkbar wäre auch eine Verdoppelung und weitere Vervielfachung des Nachtschattendermatogens durch perikline Teilungen, es ist aber wohl unwahrscheinlich, daß auf diesem Wege sofort ein vollständiger Rückschlag entstehen würde. Vielmehr ist wahrscheinlicher, daß zunächst eine Diektochimäre vom Typus eines *S. Gaertnerianum* Wklr. (SSLL...) entstehen würde, die dann ihrerseits durch weitere perikline Spaltungen im Ektosoma den Rückschlag liefern würde. Da dieser Vorgang, außer in einer Frucht (s. S. 697), bisher nicht beobachtet wurde, scheinen Dermatogenspaltungen nicht gerade häufig zu sein.

Um einen Rückschlag zur Tomate entstehen zu lassen, wäre gleichzeitig eine Vervielfachung der L II und eine Durchbrechung der L I erforderlich. Die zu fordernde Gleichzeitigkeit dieser beiden Ereignisse macht es verständlich, daß derartige Rückschläge nur selten aufgetreten sind. Wird nur die äußerste Tunicaschicht (L I) durchbrochen, so erhalten wir eine Chimäre vom Aufbau LSSS..., also mit Tomatenepidermis über Nachtschattenendosoma = *S. tubingense* Wklr. Da auch diese Chimäre außer im Fall eines Fruchtsektors (s. S. 699) nicht aufgetreten ist, kann man wiederum darauf schließen, daß Perforationen der L I ziemlich selten sind.

Tritt andererseits allein eine Verdoppelung der L II ein, so erhalten wir eine Chimäre SLLS..., die sicherlich leicht in eine äußerlich nicht

davon zu unterscheidende SLLL...-Chimäre übergehen wird, d.h. eine Chimäre aus Nachtschattenepidermis über Tomatenendosoma = *S. Koelreuterianum* Wklr., wie sie tatsächlich recht häufig auftritt und auch in den blauroten Früchten bzw. dem blauroten Sektor der an 3. Stelle beschriebenen Frucht in Erscheinung tritt.

Es bleibt nur noch übrig, den Übergang in die diplochlamyde Chimäre LLSS... zu erklären. Hierzu ist ähnlich wie bei der Entstehung der reinen Tomatenrückschläge gleichzeitig eine Durchbrechung der L I und in diesem Fall lediglich eine Verdoppelung der L II erforderlich, Umstände, die die Seltenheit auch dieses Ereignisses verständlich machen. Tatsächlich ist eine vollständige vegetative Umwandlung bisher nur ein einziges Mal erfolgt, eben der Fall, der Veranlassung zur Beschreibung gegeben hat. Daneben sind nur zwei oder drei sektoriale Umwandlungen in Blüten beobachtet worden, wobei jedoch offenbleiben muß, ob es sich um Umwandlungen zur diplochlamyden Chimäre oder um reine Tomatenrückschläge gehandelt hat, da keine genauere Untersuchung vorgenommen werden konnte.

Die Umwandlung zur LLSS...-Chimäre konnte nun morphologisch und anatomisch etwas genauer verfolgt werden. Die Änderung in der Blattmorphologie war nicht so auffällig, daß sie allein schon besonders ins Auge gefallen wäre. Lediglich die Tendenz zur Fiederschnittigkeit, die bei der Ausgangsform durchaus schon vorhanden ist, war etwas ausgeprägter. Die Änderung in der Behaarung war hingegen sehr charakteristisch. Davon wird weiter unten die Rede sein. Vor allem auffallend war die Änderung in der Blütenform und -farbe. War vorher die Blüte als eine modifizierte Nachtschattenblüte anzusprechen, so trug der umgewandelte Sproß jetzt Blüten von Tomatencharakter mit rein gelber Krone sowie tomatenähnlichen Antheren und Griffeln. Die Früchte waren im Gegensatz zur Ausgangschimäre gut entwickelt und von der typischen Form und Farbe des *Lycopersicon pimpinellifolium*. Lediglich die schwachen violetten Streifen an der Fruchtbasis und der geringe Samenansatz wiesen darauf hin, daß es sich nicht um reine *pimpinellifolium*-Früchte handeln konnte.

In der Stengelanatomie, besonders in der Epidermisbeschaffenheit, war die Umwandlung auch anatomisch zu verfolgen. Die Epidermis der Chimäre 53 ist eine typische Nachtschattenepidermis mit großen, relativ dickwandigen Zellen, Spaltöffnungen mit charakteristischen Nebenzellen, spärlicher grober Behaarung und ebenfalls spärlich verteilten Drüsenhaaren mit meist keulenförmigen mehrzelligen Köpfchen. Die Umwandlung machte sich dadurch bemerkbar, daß in einem schmalen Streifen kleinere, dünnwandigere Zellen mit einer dichteren, feinen Behaarung, aufrechten Drüsenhaaren mit vierzelligen Köpfchen und Spaltöffnungen ohne besonders hervortretende Nebenzellen auftraten (Abb. 2 und 10).

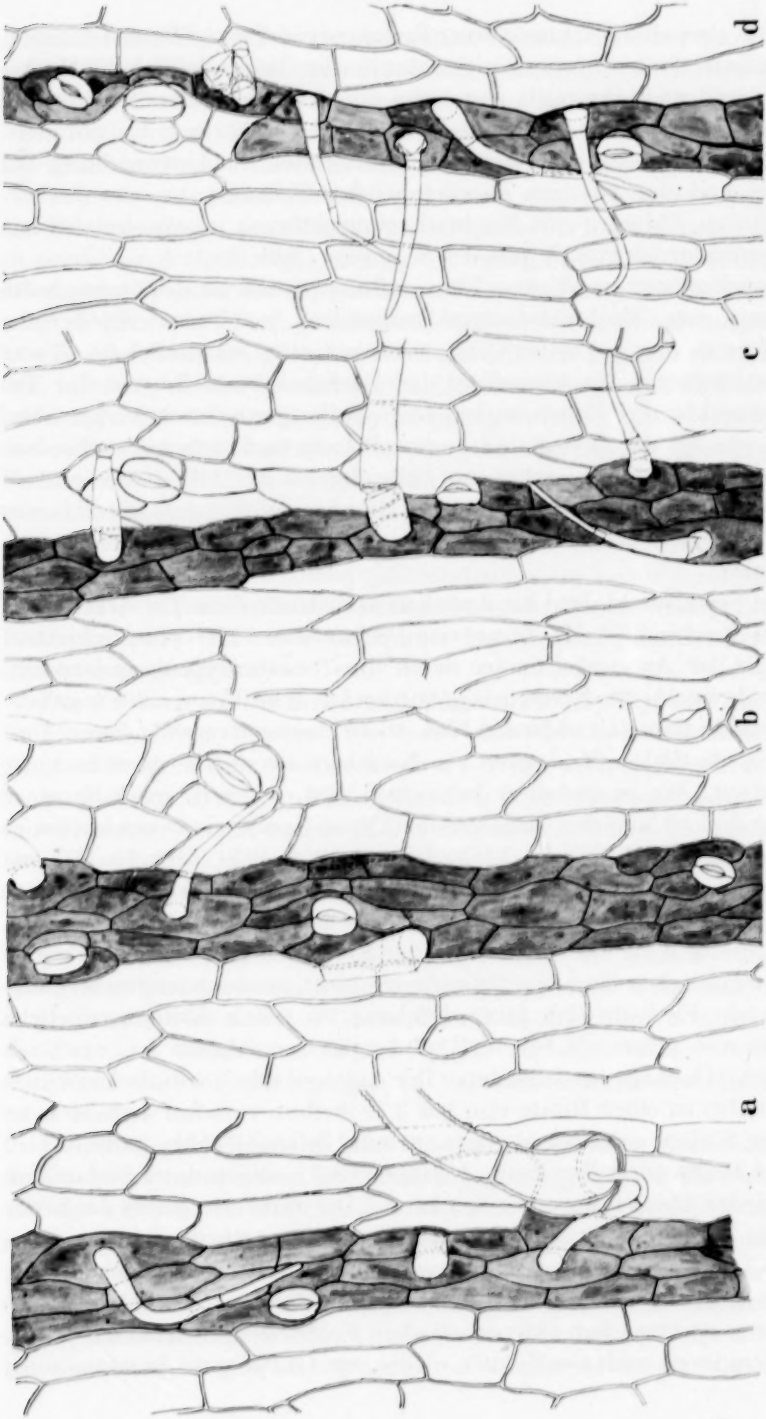


Abb. 10. Ausschnitte aus dem Stengelabschnitt, in dem sich die Umwandlung zur LLSS...-Chimäre vollzogen hat. Man beachte die Unterschiede in Zellgröße, Membranstärke, Spaltöffnungsgröße und Behaarung. Vergr. etwa 95fach

Dies alles aber sind Merkmale einer Tomatenepidermis. Dieser Tomatenepidermisstreifen verbreiterte sich immer mehr, bis schließlich die Nachtschattenepidermis ihrerseits nur mehr auf einen schmalen Streifen beschränkt war. In dem Maße, in dem die Verbreiterung des tomatenartigen Epidermisstreifens zunahm, vollzog sich die Umwandlung des Stengels und der aus ihm hervorgehenden Seitenorgane von der ursprünglichen Chimäre mit Nachtschattenepidermis in eine solche mit Tomatenepidermis vom Typus des *S. proteus* (Abb. 2).

Bemerkenswert an diesem Umwandlungsprozeß ist der sprunghafte Übergang von Nachtschattenepidermiszellen zu Tomatenepidermiszellen, wie an dem schmalen Umwandlungsstreifen ersichtlich ist. Trotz der unmittelbaren Nachbarschaft der Nachtschattenzellen ist der Tomatencharakter der Zellen in dem Umwandlungsstreifen unverkennbar, ebenso wie an der Natur der unmittelbar benachbarten verschiedenartigen Fruchtepidermiszellen im Falle der an 3. Stelle beschriebenen Frucht kein Zweifel bestehen konnte. Hier bei der Stengelepidermis war das besonders an den Haaren, Drüsenhaaren und Spaltöffnungen unzweifelhaft.

Vom Standpunkt der Chimärentheorie sind alle diese Tatsachen ohne weiteres verständlich im Sinne von Perforationen der Nachtschattenepidermis der Ausgangschimäre durch die Tomatenhypodermalschicht, die nun ihrerseits zur Epidermis geworden ist. Die Theorie der vegetativen Hybridisation (GLUŠČENKO 1948, 1950) hingegen vermag diesen Umschlag *in sämtlichen Merkmalen* von Nachbarzelle zu Nachbarzelle nicht zu erklären. Wo es trotzdem behauptet wird, wie z. B. im Falle einer offenbar diplochlamyden Chimäre vom Typus *Lycopersicon esculentum* + *Solanum nigrum* II (SSLL...) (GLUŠČENKO 1948, 1950, Abb. 70, IV), wo in einer Epidermis von im allgemeinen Nachtschattencharakter unvermittelt tomatenartige Drüsenhaare aufgetreten sein sollen, liegt der Verdacht nahe, daß die Gesamtstruktur der Epidermis in der Nachbarschaft der vermeintlichen Tomatendrüsenhaare nicht genau genug untersucht worden ist. Es kann sich dabei durchaus um lokale diskontinuierliche Perforationen gehandelt haben. Daß dergleichen möglich ist, war auch an unserer Chimäre festzustellen. Der anfangs sehr schmale Umwandlungsstreifen in einer Breite von nur 3 Zellreihen verschmälerte sich an manchen Stellen auf zwei oder gar nur eine Zellreihe (Abb. 10d), so daß man sich leicht vorstellen kann, daß eine primär eingetretene Perforation auch wieder überwachsen werden kann. Das wird vor allem dann der Fall sein können, wenn sie nicht schon am Vegetationspunkt, sondern erst im Laufe der späteren Differenzierung eintritt. Auf solche Weise können Epidermisinseln endo- oder mesosomatischen Charakters innerhalb der sonst typischen ektosomatischen Epidermis verstreut auftreten. Außerdem ist es noch zweifelhaft, ob die von GLUŠČENKO beschriebenen

Drüsenhaare wirklich Tomatendrüsenhaare waren, denn bei *S.n.* kommen Drüsenhaare mit vierzelligen Köpfchen, allerdings viel kürzer gestielt als bei der Tomate und wesentlich spärlicher auch vor (WINKLER 1916, Abb. 10; BRABEC 1954, Abb. 10). Hier kann also in der Beurteilung der Epidermismerkmale durchaus eine Fehldeutung vorgelegen haben.

Betrachten wir zusammenfassend die an unserer Chimäre aufgetretenen Veränderungen, so erkennen wir einerseits die hohe Neigung der L II zu perikliner Aufspaltung (häufiger Übergang in SLLL...), andererseits die geringe Neigung der L I zu einer solchen Spaltung (bisher kein Übergang in SSLL...). Perforationen sind offenbar relativ seltene entwicklungsmechanische Ereignisse, wie aus den seltenen Tomatenrückschlägen, dem einmaligen, hier beschriebenen Umwandlungsprozeß und dem nur bei einigen Früchten realisierten Übergang in LSSS... hervorgeht. Für das relativ häufige Auftreten der S.*n.*-Rückschläge ist allerdings eine Perforation der L II die wahrscheinlichste Erklärung. Das erscheint verständlich, da sich die Tomaten-L II in der beiderseitigen Umklammerung durch Nachtschattenschichten zweifellos in einer schwierigen wachstumsphysiologischen Lage befindet. Theoretisch wäre es wohl möglich, mit Hilfe von experimentellen Entmischungsmethoden (BERGANN und BERGANN 1959) alle vier bekannten klassischen Solanum-Periklinalchimären zu gewinnen.

Die Existenz der beschriebenen Mesochimäre eröffnet eine Reihe von Problemen. Einmal lassen sich daran entwicklungsgeschichtliche Vergleiche mit den Befunden LANGES an den Winklerschen Chimären, ferner denjenigen von SATINA und BLAKESLEE an ihren chromosomalen *Datura*-chimären sowie von DERMEN (z.B. 1953) und anderen (vgl. BRABEC, im Druck) an mehreren anderen Objekten durchführen, insbesondere hinsichtlich der Frage, ob der Anteil der verschiedenen Tunicaschichten am Aufbau der Seitenorgane des Sprosses auch hier mit dem bei *Datura* vorgefundenen Schema übereinstimmt, oder ob die Einschaltung einer einzigen artverschiedenen Schicht Abweichungen zur Folge hat. Besonders deutlich wird sich auf Grund ihrer karyologischen Kennzeichnung das Schicksal der 2. Tunicaschicht (L II) verfolgen lassen. Auch über die Mechanik der Veränderungen am Vegetationspunkt sind Aufschlüsse zu erwarten.

In genetischer Hinsicht kann hier mit besonderer Eindringlichkeit die Frage der spezifischen Beeinflussung und vegetativen Bastardierung verfolgt werden. Im Falle unserer Chimäre ist eine durch ihre karyologischen Merkmale ($2n = 24$) klar erkennbare Schicht am Vegetationspunkt vorhanden, die beiderseits von ebenso klar durch ihre karyologischen Merkmale ($2n = 4x = 144$) erkennbare Schichten eingeschlossen wird. Wenn überhaupt Einwirkungen von genetischer Tragweite denkbar sind, dann hier. Bisher kann schon festgestellt werden, daß an den

an der Chimäre aufgetretenen Rückschlägen zu reinen Arten keine von der Merkmalsnorm der beteiligten Arten abweichende Merkmalsänderungen beobachtet wurden, die als spezifische Änderungen anzusprechen wären. Vor allem trifft das für die Tomatenrückschläge zu, für die am ehesten eine Beeinflussung zu erwarten wäre, da sie aus einer seit über 7 Jahren beiderseits von andersartigem Gewebe umschlossenen Schicht hervorgegangen sind. Sobald aber diese Schicht sich aus der Umklammerung durch das Nachtschattengewebe zu befreien und z. B. die Funktion einer Epidermis zu übernehmen vermag, zeigt sie unbeeindruckt von der jahrelangen physiologischen Beeinflussung unverändert den ihr eigenen idiotypischen Charakter, d. h. sie liefert eine typische Tomatenepidermis. Da die bisherigen Nachkommenschaftsprüfungen für eine endgültige Stellungnahme noch nicht ausreichen, soll auf diesem Wege die Frage der genetisch wirksamen Beeinflussung weiter verfolgt werden.

Andererseits sind gewisse Beeinflussungen zwischen den Chimärenpartnern unverkennbar vorhanden, wie an der Variation der Nachtschattenfruchtepidermis und besonders eindrucksvoll am Verhalten des Chimärenpollens zu erkennen ist. Besonders im 2. Fall können sich Möglichkeiten eröffnen, in die Frage der Stoffwechselbeziehungen zwischen Chimärenpartnern einzudringen.

Zusammenfassung

1. Es wird eine Mesochimäre aus *Solanum nigrum* L. und *Lycopersicon pimpinellifolium* Mill. beschrieben, bei der ein einschichtiges Mesosoma von *Lycopersicon pimpinellifolium* geliefert wird.

2. Der histologische Aufbau der Chimäre sowie ihre tatsächlichen und theoretisch möglichen Umwandlungen in andere Chimärentypen und ihre Rückschläge zu den Elternarten werden beschrieben und erörtert.

3. Die Bedeutung der Chimäre für entwicklungsgeschichtliche, genetische und physiologische Probleme im Zusammenhang mit der Frage der Stoffwechselbeziehungen zwischen Chimärenpartnern wird besprochen.

Herrn Dr. H. KALDEWEY, Saarbrücken, danke ich für die Ausführung von photographischen Arbeiten.

Literatur

BERGANN, F., u. L. BERGANN: Über experimentell ausgelöste vegetative Spaltungen und Umlagerungen an chimärischen Klonen, zugleich als Beispiele erfolgreicher Staudenauslese. *Pelargonium zonale* Ait. „Madame Salleron". Züchter **29**, 361 bis 374 (1959).

BRABEC, F.: Untersuchungen über die Natur der Winklerschen Burdonen auf Grund neuen experimentellen Materials. Planta (Berl.) **44**, 562—606 (1954).

— Über eine bisher nicht bekannte Chimärenumwandlung. Ber. dtsch. bot. Ges. **68**, (8)—(9) (1955).

— Pfropfung und Chimären. In Handbuch der Pflanzenphysiologie, Bd. 15. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer. (Im Druck.)

Dermen, H.: Periclinal cytochimeras and origin of tissues in stem and leaf of peach. Amer. J. Bot. **40**, 154—168 (1953).

Gluščenko, I. J.: Die vegetative Hybridisation von Pflanzen. Kultur und Fortschritt Berlin 1948, 1950.

Johansen, D. A.: Plant microtechnique. New York and London: McGraw-Hill, Book Comp. 1940.

Lange, F.: Vergleichende Untersuchungen über die Blattentwicklung einiger *Solanum*-Chimären und ihrer Elternarten. Planta (Berl.) **3**, 13—282 (1926).

Lehmann, C. O.: Das morphologische System der Kulturtomaten (*Lycopersicon esculentum* Miller). Züchter 3. Sonderh. (1955).

Lichte, H. F.: Über die Physiologie von Angiospermenpollen und ihre Bedeutung für die Pflanzenzüchtung. Angew. Bot. **31**, 1—28 (1957).

Nuernbergk, E. L.: Zur Technik der vergleichenden Messung der Photosynthese mittels des URAS und ihre Anwendung auf die Untersuchung periodischer Photosynthese-Kurven. Gartenbauwiss. **2**, (20), 58—91 (1955).

Pätau, K.: Zur statistischen Beurteilung von Messungsreihen. Biol. Zbl. **63**, 152—168 (1943).

Renner, O.: Zur Kenntnis der nichtmendelnden Buntheit der Laubblätter. Flora (Jena) **30**, 218—290 (1936a).

— Zur Entwicklungsgeschichte randpanaschierter und reingrüner Blätter von *Sambucus*, *Veronica*, *Pelargonium*, *Spiraea*, *Chlorophytum*. Flora (Jena) **30**, 454—466 (1936b).

Satina, S., and A. F. Blakeslee: Periclinal chimeras in *Datura stramonium* in relation to development of leaf and flower. Amer. J. Bot. **28**, 862—871 (1941).

— — and A. G. Avery: Demonstration of the three germ layers in the shoot apex of *Datura* by means of induced polyploidy in periclinal chimeras. Amer. J. Bot. **27**, 895—905 (1940).

Winkler, H.: *Solanum tubingense*, ein echter Pfropfbastard zwischen Tomate und Nachtschatten. Ber. dtsch. bot. Ges. **26**, 595—608 (1908).

— Weitere Mitteilungen über Pfropfbastarde. Z. Bot. **1**, 315—345 (1909).

— Über die experimentelle Erzeugung von Pflanzen mit abweichenden Chromosomenzahlen. Z. Bot. **8**, 417—531 (1916).

— Über einen Burdonen von *Solanum lycopersicum* und *Solanum nigrum*. Planta (Berl.) **27**, 680—707 (1938).

Dr. Franz Brabec, Hamburg 36,
Staatsinstitut für Allgemeine Botanik,
Jungiusstr. 6—8.

Autorenverzeichnis des 55. Bandes

Appel, E. s. Brauner, L. S. 226

Bargen, G. v., Indol-3-Essigsäure im Apfel. Kurze Mitteilung. S. 112

Bartels, H., Enzymaktivitäten in ruhenden und keimenden Samen von *Pinus nigra* Arn. S. 573

Brabec, F., Über eine Mesochimäre aus *Solanum nigrum* L. und *Lycopersicon pimpinellifolium* Mill. S. 687

Brauner, L., und E. Appel, Zum Problem der Wuchsstoff-Querverschiebung bei der geotropischen Induktion. S. 226

Bremer, H. J., und H. G. Schweiger, Der NH_3-Gehalt kernhaltiger und kernloser *Acetabularien*. S. 13

Bücker, W. s. Kessler, E. S. 512

Čatský, J., Zur Frage der p_H-Bestimmung bei colorimetrischen Assimilationsmessungen. S. 381

Engel, H. s. Friederichsen, I. S. 313

Engelmann, W., Endogene Rhythmik und photoperiodische Blühinduktion bei *Kalanchoe*. S. 496

Falk, H., Magnoglobuli in Chloroplasten von *Ficus elastica* Roxb. S. 525

Franke, W., Über Beziehungen der Ektodesmen zur Stoffaufnahme durch Blätter. I. Mitteilung. Beobachtungen an *Plantago major* L. S. 390

— Über die Beziehungen der Ektodesmen zur Stoffaufnahme durch Blätter. II. Mitteilung. Beobachtungen an *Helxine soleirolii* Req. S. 533

Frenzel, B., Zur Ätiologie der Anreicherung von Aminosäuren und Amiden im Wurzelraum von *Helianthus Annuus* L. Ein Beitrag zur Klärung der Probleme der Rhizosphäre. S. 169

Friederichsen, I., und H. Engel, Der Abschußrhythmus der Fruchtkörper von *Sphaerobolus stellatus* (Thode) Pers. S. 313

Gantzer, E., Wirkung von Cumarin auf Wachstums- und Entwicklungsvorgänge und seine Wanderungsfähigkeit im Pflanzengewebe. 235

Geitler, L., Spontane Rotation und Oscillation des Chromatophors in den Haarzellen und Zoosporangien von *Coleochaete soluta*. S. 115

Gessner, F., und L. Hammer, Die Photosynthese von Meerespflanzen in ihrer Beziehung zum Salzgehalt. S. 306

Girbardt, M., Licht- und elektronenoptische Untersuchungen an *Polystictus versicolor* (L.). S. 365

Hammer, L. s. Gessner, F. S. 306

Haupt, W., Die Chloroplastendrehung bei *Mougeotia*. II. Mitteilung. Die Induktion der Schwachlichtbewegung durch linear polarisiertes Licht. S. 465

Kern, H., Zur quantitativen Bestimmung von Nucleinsäuren. S. 259

Kessler, E., und W. Bücker, Über die Wirkung von Arsenat auf Nitratreduktion, Atmung und Photosynthese von Grünalgen. S. 512

Kiermayer, O., Die formative Wirksamkeit der 2.3.5-Trijodbenzoesäure (Tiba) in Gegenwart von Gibberellinsäure (GA). S. 153

Klingmüller, W., Über die Photolyse von Heteroauxin im ultravioletten Licht. p_H-Abhängigkeit und Einfluß der Sauerstoffkonzentration. S. 283

Kreeb, K., Über die gravimetrische Methode zur Bestimmung der Saugspannung und das Problem des negativen Turgors. I. Mitteilung. S. 274

Kollmann, R., Untersuchungen über das Protoplasma der Siebröhren von *Passiflora coerulea*. II. Mitteilung. Elektronenoptische Untersuchungen. S. 67

Krull, R., Untersuchungen über den Bau und die Entwicklung der Plasmodesmen im Rindenparenchym von *Viscum album*. S. 598

Lange, O. L., und B. Schwemmle, Untersuchungen zur Hitzeresistenz vegetativer und blühender Pflanzen von *Kalanchoë bloßfeldiana*. S. 208

Lott, H. V., Über den Einfluß der kurzwelligen Strahlung auf die Biosynthese der pflanzlichen Polyphenole. S. 480

Lück, H. B., Beobachtungen über die Resistenz von Zellen verschiedener Stellung, nebst Bemerkungen über Akineten. S. 108

Mohr, H., und A. Noblé, Die Steuerung der Schließung und Öffnung des Plumula-Hakens bei Keimlingen von *Lactuca sativa* durch sichtbare Strahlung. S. 327

— und E. Peters, Der Phototropismus und das lichtabhängige Längenwachstum des Hypokotyls von *Sinapis alba* L. S. 637

— und I. Pichler, Der Einfluß hellroter und dunkelroter Strahlung auf die geotropische Reaktion der Keimlinge von *Sinapis alba* L. S. 57

— und G. Schoser, Eine mit Xenonbögen ausgerüstete Interferenzfilter-Monochromatoranlage für kurzwellige sichtbare und langwellige ultraviolette Strahlung. S. 143

— und M. Wehrung, Die Steuerung des Hypokotylwachstums bei den Keimlingen von *Lactuca sativa* L. durch sichtbare Strahlung. S. 438

Muschik, M., Über das Zusammenwirken von sichtbarer und infraroter Strahlung auf die Induktion der Ährenanlage von *Hordeum vulgare*. S. 292

Noblé, A. s. Mohr, H. S. 327

Penner, J., Über den Einfluß von Gibberellin auf die photoperiodisch bedingten Blühvorgänge bei *Bryophyllum*. S. 542

Peters, E. s. Mohr, H. S. 637

Pichler, I. s. Mohr, H. S. 57

Plempel, M., Die zygotropische Reaktion bei Mucorineen. I. Mitteilung. S. 254

Rudolph, H., Weitere Untersuchungen zur Wärmeaktivierung der Sporangiosporen von *Phycomyces blakesleeanus*. II. Mitteilung. S. 424

— Changes of the osmotic value during the development of the ovule. S. 343

Ryczkowski, M., Changes of the viscosity of the central vacuolar sap during the development of the ovule. S. 357

Schneider, G., Biochemische und entwicklungsphysiologische Untersuchungen zur Frage des Schossens und der Blütenbildung der Zuckerrübe. I. Mitteilung. Versuche zur experimentellen Beeinflussung der Blütenbildung und chemische Untersuchungen zum Nachweis der freien β-Indolylessigsäure. S. 669

Schoser, G. s. Mohr, H. S. 143

Schwarze, P., Über die Fraktionierung des Protoplasmas von *Phaseolus*-Arten und *Phaseolus*-Artbastarden. S. 451

— Über den Einfluß der Verdunklung auf die Plasmafraktionen isolierter Blätter. S. 461

— Über die gesteigerte Peroxydaseaktivität in gestörten *Phaseolus*-Artbastarden. S. 630

Schweiger, H. G. s. Bremer, H. J. S. 13

Schwemmle, B. s. Lange, O. L. S. 208

Wehrung, M. s. Mohr, H. S. 438

Werz, G., Anreicherung von Ribonucleinsäure in der Wuchszone von *Acetabularia mediterranea*. S. 22

— Über Strukturierungen der Wuchszonen von *Acetabularia mediterranea*. S. 38

Ziegler, H., Untersuchungen über die Feinstruktur des Phloems. I. Mitteilung. Die Siebplatten bei *Heracleum Mantegazzianum* Somm. et Lev. S. 1

Zinsmeister, H. D., Das phototropische Verhalten der Blütenstiele von *Cyclamen persicum* Hybr. S. 647